

Aus dem Charité Centrum 13

für [Innere Medizin mit Kardiologie, Gastroenterologie und Nephrologie](#)

Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Bertram Wiedenmann)

Habilitationsschrift

Mechanismen der T-Zell Aktivierung und ihre Bedeutung für die Entstehung viraler und autoimmuner Lebererkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Eckart Schott

aus Frankfurt/Main

Eingereicht: März 2007

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Lohse

2. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Trautwein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einführung in die Thematik	4
2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext	8
2.1. Generelle Mechanismen T-zellulärer Immunität	8
2.1.1. Aktivierung von CD8 T-Zellen (P1, P2)	9
2.1.2. Selektion von CD8 T-Zellen (P3, P4)	14
2.2. T-zelluläre Immunität bei der chronischen HCV Infektion	19
2.2.1. Beeinflussung der T-Zell Antwort gegen HCV durch CTLA4 (P5)	20
2.2.2. Die Bedeutung des Toll-like Rezeptor 7 für die T-zelluläre Immunität gegen HCV (P6, P7)	24
2.3. T-zelluläre Immunität bei autoimmunen Lebererkrankungen (P8)	30
3. Diskussion	34
4. Zusammenfassung	42
5. Literaturverzeichnis	43
Danksagung	56
Eidesstattliche Versicherung	57

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASBT	Apical sodium-dependent bile transporter
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	Dendritische Zelle
DN	Doppelt negativ (Thmyozyten)
DP	Doppelt positiv (Thmyozyten)
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MDC	Myeloische dendritische Zelle
MHC	Major histocompatibility complex (antigen)
MyD88	Myeloid differentiation factor-88
NK	Natürliche Killer (-Zelle)
NS	Non-structural (protein)
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCR	T-Zell Rezeptor
TFR	Transferrin
Th	T-Helfer (-Zelle)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1. Einführung in die Thematik

Das Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen und einen erworbenen Teil. Das erworbene Immunsystem erkennt Pathogene durch hochvariable Rezeptoren auf spezialisierten Immunzellen, die nur in Wirbeltieren vorkommen. Die Interaktion eines T- oder B-Zell-Rezeptors mit seinem Antigen führt zur klonalen Expansion und schließlich mit hoher Effizienz zur Eradikation des Pathogens. Dieser Mechanismus erfordert jedoch Zeit. Die angeborene Immunantwort hingegen setzt ohne wesentliche zeitliche Verzögerung ein. Organspezifische gewebsständige Zellen des angeborenen Immunsystems stellen die erste Abwehrlinie gegen in den Wirt eindringende Organismen dar und kontrollieren gleichzeitig unterschiedliche Funktionen der adaptiven Immunantwort (1). Sie erkennen Pathogene durch hochkonservierte Rezeptoren, die nahezu allen Organismen gemeinsam sind. Die Pathogenerkennung wird unter anderem durch Toll-like Rezeptoren (TLR) vermittelt. *Toll* wurde primär als Membranrezeptor beschrieben, der die dorso-ventrale Ausrichtung der Körperachse der Fruchtfliege *Drosophila* während der Embryogenese steuert (2). Später wurde gezeigt, daß *Toll* zudem eine notwendige Komponente der antifungalen Immunantwort der *Drosophila* darstellt (3). Das erste humane Ortholog des *Drosophila Toll* wurde 1997 von Janeway und Kollegen als ein Rezeptor beschrieben, der angeborene Immunität vermittelt (4). Kurze Zeit später wurde TLR4 als ein Rezeptor identifiziert, der Lipopolysaccharid (LPS), die Hauptkomponente der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, bindet und so zu Inflammation führt. Er ist dadurch maßgeblich an der angeborenen Immunantwort gegen Gram-negative Bakterien beteiligt (5, 6). Bisher wurden 13 verschiedene Toll-like Rezeptor Homologe identifiziert. TLR erkennen invariante, mit Pathogenen assoziierte molekulare Strukturen, so genannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Zu diesen mikrobiellen Motiven gehören u.a. LPS, Lipoteichonsäure, Peptidoglykane, Lipoproteine Gram-negativer Bakterien, virale DNA und RNA, sowie bakterielle CpG-DNA (unmethylierte, an CpG-Motiven reiche DNA, die bevorzugt in Bakterien vorkommt) (7). TLR sind durch das Vorhandensein von leucinreichen Wiederholungen in der extrazellulären Komponente und einer TIR Domäne (Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne) im zytoplasmatischen Anteil gekennzeichnet. Die den TLR nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktion ist komplex. Die Produktion inflammatorischer Zytokine wird u.a. durch intrazelluläre Proteine wie den Myeloid Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), die Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK) 1-4 und den TNF- α Rezeptor assoziierten Faktor (TRAF) 6 gesteuert. Die durch diese Moleküle gebildete Signalkaskade führt letztendlich zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B (8). Außer TLR3 nutzen alle bisher identifizierten TLR diese Signalkaskade. Drei weitere Adapter-Moleküle, TIR domain-containing adapter inducing IFN- β (TRIF oder TICAM-1), TIR domain-containing adapter protein (TIRAP) bzw. MyD88-adaptor like (Mal) und TRIF-related adapter molecule (TRAM) spielen eine kritische Rolle bei MyD88-unabhängigen Signalkaskaden (9, 10).

Die Signale, die zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen, werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) vermittelt. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die dendritischen Zellen (DC). Unreife DC befinden sich im peripheren Gewebe und zu einer geringeren Zahl auch im Blut. Dort nehmen sie permanent Antigen auf, prozessieren es und präsentieren die resultierenden Fragmente auf MHC Molekülen (Major Histocompatibility Complex-Molekülen). DC exprimieren TLR, über die die Erkennung mikrobieller Moleküle erfolgt (11). Die Bindung solcher mikrobieller Bestandteile an TLR induziert eine Reifung der DC, die daraufhin das Gewebe verlässt und zum drainierenden Lymphknoten wandert. Gleichzeitig werden kostimulatorische Moleküle (u. a. CD80 und CD86) exprimiert, die zur T-Zell Aktivierung notwendig sind. Auch MHC Moleküle werden nun bevorzugt an der Zelloberfläche exprimiert, was eine effektivere Aktivierung von T-Zellen zur Folge hat (12). Zusätzlich werden Zytokine freigesetzt, die die Reifung und Aktivierung von T-Zellen begünstigen. Die zentrale Rolle der TLR im Hinblick auf die Aktivierung von Lymphozyten lässt sich im Tiermodell belegen. Bei Mäusen, bei denen die TLR Signaltransduktion unterbrochen ist (MyD88 knock-out), kommt es nach Impfung mit Antigen in Freund's Adjuvant, das eine Stimulation der TLR bewirkt, nur zu einer unzureichenden Aktivierung der Lymphozyten (13).

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten, die hochspezifisch für bestimmte Antigene sind und diese mit Hilfe hochvariabler Rezeptoren erkennen, den B- und T-Zell Rezeptoren. Die Antigen-spezifität des B-Zell Rezeptors entsteht durch somatische Mutation, die eine zunehmende Affinität des Rezeptors im Laufe einer Immunantwort bewirkt und so, wenn auch mit zeitlichem Verzug, eine spezifische Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen erlaubt (14). Das weitgehende Fehlen einer somatischer Hypermutation des T-Zell Rezeptors verhindert, daß sich die Antigen-spezifität einmal im Thymus selektierter T-Zellen noch einmal ändert (15). Eine weitere Besonderheit des erworbenen Immunsystems ist, daß im Anschluß an eine durchgemachte Immunantwort ein immunologisches Gedächtnis resultiert, das im Falle eines erneuten Kontakts mit dem gleichen Antigen eine umgehende spezifische Antwort gewährleistet (16). B-Lymphozyten synthetisieren Antikörper, die zum einen als membranständige Antigenrezeptoren dienen,

zum anderen in sezernierter Form Antigen binden und diese somit für phagozytierende Zellen und das Komplementsystem erkennbar machen. T-Lymphozyten können entweder direkte zytotoxische Effekte ausüben oder durch die Synthese von Zytokinen andere Immunzellen bei der Erkennung von Antigenen unterstützen. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt durch professionelle APC, die an ihrer Oberfläche MHC Moleküle exprimieren, die beim Menschen auch HLA (Humanes Leukozyten Antigen) und bei der Maus H-2 heißen. Außerdem werden MHC Moleküle auch als Transplantationsantigene bezeichnet, weil zahlreiche Allelvarianten auf allen Loci vorkommen. So entsteht eine hohe interindividuelle Variabilität hinsichtlich der Expression der verschiedenen Allele, die dazu führt, daß es zu Transplantatabstoßungen kommt (17). MHC-I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC-II Moleküle vorwiegend auf professionellen APC vorkommen (18). MHC Moleküle weisen an der Oberfläche eine Bindungstasche auf, die ein Peptid aufnimmt. Im Falle von MHC-I Molekülen handelt es sich um eine Kette von 8-10 Aminosäuren (18), im Falle von MHC-II Molekülen um eine Kette von 13-17 Aminosäuren (19). MHC-I Epitope werden durch das Proteasom aus intrazellulären Bestandteilen, in der Regel also aus zelleigenen Proteinen, generiert (20). Im Gegensatz dazu werden MHC-II Epitope im endosomalen Kompartiment der Zelle generiert, in der Regel also aus phagozytiertem Fremdeiweiß (21). Der Komplex aus MHC-I Molekül und Peptid wird von CD8 T-Zellen erkannt, während der Komplex aus MHC-II Molekül und Peptid von CD4 T-Zellen aktiviert wird (22). Die Expression eines MHC-I Moleküls zusammen mit einem Peptid, das aus zelleigenem Protein stammt, führt zur Markierung der Zelle als „körpereigen“ und bewirkt in aller Regel keine Immunantwort. Um diese Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Peptiden zu gewährleisten, muß das Immunsystem geschult werden. Diese Schulung erfolgt zum einen während der Entwicklung im Thymus (zentrale Toleranz), zum anderen durch eine Unterdrückung von Immunantworten durch spezielle regulatorische T-Zellen in der Peripherie (periphere Toleranz). Ist eine Körperzelle jedoch z.B. von einem Virus infiziert, dann werden virale Bestandteile im MHC-I Kontext präsentiert, und das Immunsystem wird aktiviert. Da die strukturellen Unterschiede zwischen Selbst- und Fremdartigen minimal sein können, bedarf das Immunsystem einer fein abgestimmten Kontrolle der Immunreaktion, die eine Reaktion auf Fremdartigene zwar erlaubt, eine Reaktion auf Selbst-Antigene aber unterbindet. Kommt es zum Verlust dieser Kontrolle, entstehen Autoimmunerkrankungen, bei denen sich das Immunsystem gegen Selbst-Antigene richtet. Die Ursachen für einen solchen Verlust der Toleranz bei Autoimmunerkrankungen sind größtenteils unbekannt, sie können in einer unzureichenden Selektion von T-Zellen im

Thymus oder einem ungenügenden peripheren Toleranzmechanismus zu suchen sein (23, 24). Eine weitere Hypothese macht die Ähnlichkeit von Fremd- mit Selbst-Antigenen („Molekulare Mimikry“) oder die Präsentation von Selbst-Antigenen in einem inflammatorischen Kontext für die Entstehung von Autoimmunität verantwortlich (25, 26). Die Aufklärung der Vorgänge, die der Selektion und der Aktivierung von T-Lymphozyten zugrundeliegen, ist essentiell für das Verständnis der Entstehung von Autoimmunität und der fehlenden Immunität gegen bestimmte Antigene. So ist das Fehlen einer effektiven Immunantwort ein Kennzeichen der chronischen Hepatitis C Virus-Infektion.

2. Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext

2.1. Generelle Mechanismen T-zellulärer Immunität

T-Lymphozyten lassen sich anhand der Expression ihres Korezeptors in CD8 und CD4 positive T-Lymphozyten unterteilen. CD8 T-Zellen haben zytotoxische Eigenschaften. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Bindung ihres T-Zell Rezeptors an einen MHC-I/Peptid Komplex. CD4 Helferzellen werden durch die Bindung ihres T-Zell Rezeptors an einen MHC-II/Peptid Komplex aktiviert. Die Korezeptoren CD8 und CD4 übermitteln zusätzliche Signale (27). Die Signaltransduktion erfolgt durch den CD3 Komplex und führt zur Aktivierung der Kinase ZAP-60, die die weitere intrazelluläre Signalkaskade induziert (28). Zur vollständigen Aktivierung wird ein zweites Signal benötigt, nämlich die Bindung eines kostimulatorischen Moleküls wie CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) an CD28 (29). Umgekehrt exprimieren aktivierte T-Zellen den Rezeptor CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), der CD80 und CD86 bindet und auf diese Weise eine negative Regulation bewirkt (30).

CD8 T-Zellen verfügen über mehrere Mechanismen, ihren zytotoxischen Effekt auszuüben: Sie setzen die zelltoxischen Moleküle Perforin und Granzym frei, ligieren das Molekül fas auf der Oberfläche von Zielzellen durch fas-Ligand und setzen die Effektorzytokine IFN- γ und TNF- α frei, die zur Aktivierung anderer Immunzellen wie Makrophagen und B-Zellen führen (31-34).

CD4 T-Zellen verfügen über ein stärker differenziertes Spektrum von Effektorfunktionen. Diese Funktionen variieren, je nachdem, unter welchen Bedingungen die Aktivierung erfolgt (35). Abhängig von der Art der Antigen-präsentierenden dendritischen Zelle, der Stärke des Stimulus, der Expression von Notch-Liganden (36), dem Zytokinmilieu (37) und den involvierten Toll-like Rezeptoren (8) erfolgt die Aktivierung unterschiedlicher Differenzierungsprogramme. Das Differenzierungsmuster von CD4 T-Zellen kann vereinfachend in zwei Kategorien eingeteilt werden: Th1-Zellen entstehen nach Aktivierung durch DC, die den Notch-Liganden Delta exprimieren, unter dem Einfluß von IL-12 und IFN α , sowie der TLR4, 7 und 9, zeichnen sich durch die Produktion der Effektorzytokine IFN- γ und Lymphotoxin aus und vermitteln eine zelluläre, zytotoxische Immunantwort. Th2 Zellen entstehen nach Stimulation durch DC, die den Notch-Liganden Jagged exprimieren, unter dem Einfluß des Zytokins IL-4 und des TLR2, produzieren die Effektorzytokine IL-4 und IL-5 und vermitteln dadurch eine humorale oder allergische Immunantwort. Die Zytokine TNF- α und GM-CSF werden bevorzugt aber nicht ausschließlich von Th1 Zellen produziert,

während umgekehrt IL-10 und IL-13 bevorzugt von Th2 Zellen synthetisiert werden (38, 39). Als Hauptregulatoren für diese Differenzierung wurden die Transkriptionsfaktoren GATA-3 (für eine Th2-Antwort, (40)) und T-bet (für eine Th1-Antwort, (41)) identifiziert.

2.1.1. Aktivierung von CD8 T-Zellen (P1, P2)

Die Aktivierung von T-Zellen nach Bindung eines MHC/Peptid-Komplexes an ihren T-Zell Rezeptor kann durch zwei unterschiedliche Hypothesen erklärt werden: Zum einen kann die Bindung eine Konformationsänderung bewirken, die zur Signaltransduktion führt, zum anderen kann die Bindung mehrerer T-Zell Rezeptoren eine Vernetzung der T-Zell-Rezeptoren bewirken, deren intrazelluläre Domänen sich dann gegenseitig aktivieren können. Da die direkte Untersuchung der Konformation des TCR bei der Aktivierung schwierig ist (42), erfolgten die meisten Untersuchungen an isolierten T-Zellen, die durch mono- oder multivalente Liganden aktiviert wurden. In diesem Modell spricht die Aktivierung durch monovalente Liganden für eine Konformationsänderung des Rezeptors, wohingegen die ausschließliche Aktivierung durch multivalente Liganden ein TCR-Vernetzungsmodell favorisiert. Kinetische Untersuchungen zeigten dabei inkonsistente Ergebnisse, die sowohl auf eine TCR Dimerisierung als aktivierenden Schritt (43, 44) als auch auf eine Aktivierung durch monovalente Liganden (45) hinwiesen. Funktionelle Daten sprechen für eine Dimerisierung von TCR bei CD4 T-Zellen (46, 47), hingegen ergaben sich bei CD8 T-Zellen sowohl Hinweise auf eine Dimerisierung (48-50) als auch auf eine Aktivierung durch monovalente Liganden (51, 52). Da die bislang vorliegenden Ergebnisse inkonsistent waren, wurden die Bedingungen für die Aktivierung naiver CD8 T-Zellen mit Hilfe rekombinanter MHC-I Moleküle, sogenannter Tetramere, untersucht. Tetramäre sind synthetische MHC-I Moleküle, die mit einem definierten Peptidliganden komplementiert werden können, und die durch ein Streptavidin Molekül in Vierergruppen zusammengehalten werden. Der Vergleich solcher Tetramere mit Monomeren, d.h. einzelnen MHC-I/Peptid Komplexen, machte deutlich, daß eine multivalente Interaktion von MHC-I Molekülen mit T-Zell Rezeptoren notwendig für die Aktivierung naiver CD8 T-Zellen ist (P1). Im Rahmen der Untersuchungen wurde verständlich, warum einige der Vorarbeiten zu einem konträren Ergebnis gekommen waren: CD8 T-Zellen sind potente antigenpräsentierende Zellen, wenn ihnen ein Peptid-Antigen zugeführt wird, das keine weitere Prozessierung benötigt. Da das Peptid im MHC-I/Peptid Komplex nicht-kovalent gebunden ist, kommt es zur Freisetzung des Peptids aus dem Komplex in den Tetrameren und zur Bindung an auf den T-Zellen exprimierte MHC-I

Moleküle. Um dieses Artefakt von Effekten zu unterscheiden, die tatsächlich von professionellen APC oder rekombinanten MHC-I Molekülen ausgelöst werden, war es notwendig, ein chimäres Mausmodell zu entwickeln, das die Selektion MHC-I defizienter CD8 T-Zellen erlaubt. Dazu wurde Knochenmark von MHC-I defizienten Mäusen ($H-2K^bD^b$ ^{-/-}) in subletal bestrahlte $RAG^{-/-}$ Mäuse transferiert, die selber keine T-Zellen generieren. Die MHC-I positive Umgebung im Thymus erlaubte die Entwicklung von $H-2K^bD^b$ ^{-/-} CD8 T-Zellen. An den so gewonnenen Zellen wurden *in vitro* und *in vivo* Aktivierungsstudien durchgeführt, darunter TCR Signal-Transduktionsstudien und Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)-Markierungsstudien, die eindeutig zeigten, daß eine multivalente Bindung von T-Zell Rezeptoren und ein zusätzliches kostimulatorisches Signal notwendig für die Aktivierung naiver CD8 T-Zellen sind.

Der CD8 Korezeptor hat mehrere Aufgaben: Zum einen weist er eine adhäsive Wirkung auf, die eine festere Bindung der T-Zelle an die Antigen-präsentierende Zelle bewirkt, zum anderen ist der intrazelluläre Anteil des Moleküls mit der Kinase Ick komplexiert, die für die initialen Schritte bei der Signaltransduktion durch den TCR-Komplex notwendig ist. Das CD8 Molekül bindet an die $\alpha 3$ Domäne des MHC-I Moleküls und verstärkt damit die Avidität des TCR zum MHC-I Molekül (53, 54). Es ist unklar, wie CD8 zum TCR-MHC-I/Peptid Komplex rekrutiert wird. Als mögliche Mechanismen werden die Palmitoylierung von CD8 β und die daraus resultierende Verankerung in Lipid rafts (55), eine Rolle für Ick (56) und die konstitutive Assoziation mit dem TCR (57, 58) diskutiert. Um zu differenzieren, inwieweit die adhäsive Wirkung des CD8 Korezeptors eine Rolle bei der Interaktion zwischen CD8 T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle spielt, wurde mit synthetischen MHC-I Molekülen gearbeitet, in die Mutationen eingefügt wurden, die die CD8-Bindungskapazität eliminieren. Diese MHC-I Moleküle wurden wiederum in Tetramere eingebaut, und zwar solcher Art, daß dabei genau definiert wurde, wie viele der Arme der Tetramere den TCR binden (da sie mit dem entsprechenden spezifischen Peptid beladen sind) und wie viele das CD8 Molekül binden (da sie keine Mutation in der $\alpha 3$ Domäne tragen). Mit diesen Molekülen wurden Aktivierungsstudien und Kopräzipitationsexperimente durchgeführt. Es zeigte sich, daß dasselbe MHC-I Molekül mit einem TCR und einem CD8 Korezeptor interagieren muß, um eine effektive Aktivierung naiver CD8 T-Zellen zu ermöglichen (P2). Die unspezifische adhäsive Wirkung von CD8, das heißt die Bindung an MHC-I Moleküle, die mit einem irrelevanten Peptid beladen sind, war gering. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Bindung von CD8 an den TCR unabhängig von einer Bindung des TCR an den MHC-I/Peptid Komplex ist, daß aber die Bindung von Ick an das CD8 Molekül erst dann erfolgt, wenn das CD8 Molekül

mit einem TCR assoziiert, der eine stabile Bindung mit einem MHC-I/Peptid Komplex eingegangen ist.

Eigene Publikationen:

P1 Schott E, Bertho N, Ge Q, Maurice MM, Ploegh HL. Class I negative CD8 T cells reveal the confounding role of peptide-transfer onto CD8 T cells stimulated with soluble H2-Kb molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13735-40. URL: PM: 12374858

P2 Schott E, Ploegh HL. MHC class I tetramers that are unable to bind to CD8 reveal the need for CD8 engagement in order to activate naive CD8 T cells. Eur J Immunol. 2002 Dec;32(12):3425-34. URL: PM: 12432573

Schott E, Bertho N, Ge Q, Maurice MM, Ploegh HL.
Class I negative CD8 T cells reveal the confounding role of peptide-transfer onto
CD8 T cells stimulated with soluble H2-Kb molecules.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13735-40. Epub 2002 Oct 8.
PMID: 12374858

Schott E, Ploegh HL.

Mouse MHC class I tetramers that are unable to bind to CD8 reveal the need for CD8 engagement in order to activate naive CD8 T cells.

Eur J Immunol. 2002 Dec;32(12):3425-34.

PMID: 12432573

2.1.2. Selektion von CD8 T-Zellen (P3, P4)

Die Entwicklung von T-Lymphozyten erfolgt im Thymus. Dort wird eine Selektion der neu entstandenen Thymozyten mit dem Ziel durchgeführt, nur solche T-Zellen in die Peripherie zu entlassen, die zum einen in der Lage sind, mit Selbst-MHC Molekülen zu interagieren, also überhaupt fähig sind, von Antigen-präsentierenden Zellen des Organismus Signale zu erhalten. Zum anderen dürfen sie nicht mit Selbst-MHC/Selbst-Peptid Komplexen reagieren, da sie sonst Autoimmunität auslösen würden. Im Thymus erfolgt daher eine positive Selektion von Thymozyten, die mit Selbst-MHC interagieren, aber eine negative Selektion von Thymozyten, die mit zu starker Affinität interagieren, da sie Selbst-MHC und Selbst-Peptid erkennen. Die Selektion erfolgt im $CD4^+CD8^+$ Stadium der Entwicklung von Thymozyten durch Interaktion mit Thymusepithelzellen, die Selbst-MHC/Selbst-Peptid Komplexe präsentieren (59). Die Stärke dieser Interaktion führt zur Selektion: Eine Interaktion niedriger Affinität führt ebenso zur negativen Selektion wie eine Interaktion hoher Affinität. Nur Thymozyten, die mit mittlerer Affinität binden, werden positiv selektiert und später in die Peripherie entlassen (60). Die Stärke der Interaktion wird aber nicht nur durch die Interaktion des TCR mit dem MHC/Peptid Komplex bedingt, sondern auch durch die Wirkung kostimulatorischer und adhäsiver Moleküle (61). Bei der Untersuchung dieser Vorgänge wird meist mit TCR-transgenen Mäusen gearbeitet, für deren spezifische TCR Peptidliganden mit definierter Affinität bekannt sind. Sie werden in der Regel in Agonisten (hohe Affinität), Antagonisten oder partielle Agonisten (intermediäre Affinität) und inerte Peptide (niedrige Affinität) unterteilt (62). Agonisten führen zur Aktivierung reifer CD8 T-Zellen und bewirken bei der Selektion von CD8 T-Zellen eine negative Selektion (63). Umgekehrt führen Antagonisten zur Hemmung der Aktivierung reifer CD8 T-Zellen, bewirken aber die positive Selektion von Thymozyten (60). Allerdings gibt es auch Berichte über Agonist selektierte T-Zellen (64-66), wobei unklar bleibt, ob solche T-Zellen funktionell aktiv oder durch die besonderen Selektionsbedingungen tolerant oder inert sind (63, 65, 67). Davon unabhängig werden bestimmte Subklassen von CD8 T-Zellen mit speziellen Funktionen auch unter physiologischen Bedingungen durch Liganden mit hoher Affinität selektiert und zeigen dennoch normale Funktionen. Ein Beispiel hierfür sind $CD8\alpha\alpha$ T-Zellen, die bevorzugt im Darm gefunden werden (65, 68-70). Um die Selektionskriterien von Thymozyten unter Bedingungen zu untersuchen, die eine genaue Definition der Zahl, Affinität und Avidität der Liganden erlauben, wurden Experimente in fetalen Thymusorgan-Kulturen MHC-I defizienter Mäuse durchgeführt. In diesem System kann das Selektionsverhalten durch Zugabe rekombinanter MHC-I Moleküle untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß die Interaktion mit

Agonist beladenen MHC-I Molekülen eine positive Selektion erlaubte, offensichtlich deshalb, weil die isolierte Interaktion mit zellfreien MHC-I/Peptid Komplexen in einer insgesamt niedrigeren Avidität der Interaktion resultierte. Im Gegensatz zur Aktivierung peripherer CD8 T-Zellen war eine monovalente Interaktion zwischen TCR und MHC-I Molekül ausreichend, um eine Selektion zu ermöglichen. Außerdem war eine Interaktion zwischen MHC-I und CD8 in dieser Situation nicht obligatorisch, wie mit Hilfe von Tetrameren gezeigt wurde, deren MHC-I Moleküle eine mutierte $\alpha 3$ Domäne aufwiesen. Die *in vitro* selektierten CD8 T-Zellen wiesen einen naiven Phänotyp auf, exprimierten aber im Gegensatz zu peripheren CD8 T-Zellen das Integrin $\alpha 4\beta 7$ und zeigten eine reduzierte Expression des Selektins CD62L. Mit den so *in vitro* generierten CD8 T-Zellen wurden umfangreiche Studien durchgeführt, die ergaben, daß diese Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* voll funktionsfähig sind (P3). Aufgrund der Expression von $\alpha 4\beta 7$ fanden sich die *in vitro* selektierten CD8 T-Zellen nach Transfer in Empfängermäuse bevorzugt im darmassoziierten lymphatischen Gewebe. Die Arbeiten machten deutlich, daß das strenge Paradigma der positiven Selektion durch Antagonisten und der negativen Selektion durch Agonisten nicht korrekt ist. Vielmehr kann positive Selektion auch durch Bindung von Agonisten erfolgen und zur Generierung funktioneller CD8 T-Zellen führen. Die Expression von $\alpha 4\beta 7$ in unserem Modell und die Tatsache, daß CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen ebenfalls durch Agonisten selektiert werden, spricht für eine Ausnahmestellung der CD8 T-Zellen im Darm: T-Zellen, die potentiell durch Selbst-Antigene aktiviert werden können, wandern bevorzugt in den Darm ein. Möglicherweise steht diese Beobachtung im Zusammenhang mit der Tatsache, daß autoaggressive Erkrankungen häufig im Darm auftreten.

Schließlich wurde die Bedeutung der NK-Zellen für die Entwicklung MHC-I defizienter Thymozyten untersucht. NK-Zellen attackieren MHC-I defiziente Zielzellen. Dieser Mechanismus schützt vor viralen Infektionen, da Viren häufig zu einer Verminderung der MHC-I Expression von infizierten Zellen führen und damit der zellulären Immunität durch CD8 T-Zellen entgehen (71). MHC-I Moleküle binden an inhibitorische Moleküle auf NK-Zellen wie die Mitglieder der Ly49 Familie (72-75). Durch regelmäßigen Kontakt von MHC-I Molekülen mit Ly49 Molekülen „lernen“ NK-Zellen, wie hoch das normale Expressionsniveau von MHC-I Molekülen in ihrem Organismus ist und können so auf Veränderungen der MHC-I Expression, z.B. im Rahmen von Virusinfektionen, reagieren (76). Zusätzlich zu diesen inhibitorischen Signalen muss es aber auch aktivierende Signale für NK-Zellen geben, da bestimmte Zelltypen, z.B. Thymozyten, verstärkt von NK-Zellen angegriffen werden (77-79). Offensichtlich spielen dabei Aktivierungsmarker eine entscheidende Rolle

(80, 81). In den von uns durchgeführten Experimenten zeigte sich, daß die Entwicklung MHC-I defizienter Thymozyten in einem MHC-I exprimierenden Organismus deutlich verzögert war und daß NK-Zellen für diese Verzögerung verantwortlich waren. Dabei kam es zu einem Arrest der Thymozyten im CD4⁺CD8⁺ Stadium, in dem normalerweise die stärkste Proliferation erfolgt und der TCR exprimiert wird. Überraschenderweise exprimierten MHC-I defiziente CD4⁺CD8⁺ Thymozyten in chimären Mäusen, deren Thymusstroma MHC-I exprimiert, keinen TCR und proliferierten wesentlich weniger als ihre MHC-I positiven Gegenstücke. Aus diesen alternativen Vorläuferthymozyten entwickelten sich jedoch reife MHC-I negative CD8 T-Zellen, die in der Peripherie akkumulierten und nicht von NK-Zellen attackiert wurden. Um nachzuweisen, daß tatsächlich das fehlende MHC-I Molekül für den beobachteten Effekt verantwortlich ist, wurden Knochenmarkstammzellen *in vitro* mittels retroviralem Transfer mit einem Konstrukt infiziert, das entweder für das H-2K^b oder das H-2D^b MHC-I Molekül kodierte. Nur H-2K^b führte zu einer Wiederherstellung der Wildtypfunktion, während H-2D^b transfizierte Stammzellen weiterhin von NK-Zellen attackiert wurden. Schließlich wurde gezeigt, daß aus MHC-I defizienten Vorläufern entstandene reife CD8 T-Zellen bei Aktivierung wiederum zum Ziel von NK-Zellen wurden. Zusammengefasst zeigen die Experimente, daß NK-Zellen selektiv proliferierende Thymozyten attackieren, die kein MHC-I exprimieren, daß jedoch eine Subpopulation von Thymozyten der NK-Zell vermittelten Toxizität entgeht, indem sie einen alternativen Mechanismus benutzt, der ohne wesentliche Proliferation auskommt, um das CD4⁺CD8⁺ Stadium zu erreichen (P4).

Eigene Publikationen:

P3 Mintern JD, Maurice MM, Ploegh HL, Schott E. Thymic selection and peripheral activation of CD8 T cells by the same class I MHC/peptide complex. *J Immunol.* 2004 Jan 1; 172(1): 699-708. URL: PM: 14688383

P4 Schott E, Bonasio R, Ploegh HL. Elimination *in vivo* of developing T cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 2003 Oct 20; 198(8): 1213-24. URL: PM: 14568980

Mintern JD, Maurice MM, Ploegh HL, Schott E.
Thymic selection and peripheral activation of CD8 T cells by the same class I
MHC/peptide complex.
J Immunol. 2004 Jan 1;172(1):699-708.
PMID: 14688383

Schott E, Bonasio R, Ploegh HL.
Elimination in vivo of developing T cells by natural killer cells.
J Exp Med. 2003 Oct 20;198(8):1213-24.
PMID: 14568980

2.2. T-zelluläre Immunität bei der chronischen Hepatitis C Virus Infektion

HCV-Infektionen stellen eine enorme medizinische und sozioökonomische Herausforderung dar. Die Prävalenz der Hepatitis C Virus-Infektion in Deutschland wird auf 5/1000 geschätzt. Weltweit sind mehr als 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert (82). Nur zwischen 20% und 50% der Patienten mit akuter Hepatitis C Virus-Infektion eliminieren das Virus spontan. Dabei spielt eine robuste Aktivierung der zytotoxischen CD8 T-Zellen und der CD4 T-Helferzellen eine entscheidende Rolle (83, 84). Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion zeigt sich hingegen eine unzureichende T-Zell Antwort gegen virale Epitope (85, 86). Es ist ungeklärt, warum diese Patienten keine ausreichende T-Zell Antwort ausbilden. Möglicherweise sind so genannte "escape"-Mutationen des Virus dafür verantwortlich (87). Genetische Variationen stellen einen weiteren Faktor dar, der für den unterschiedlichen klinischen Verlauf und das unterschiedliche Ansprechen auf eine antivirale Therapie verantwortlich sein könnte. Dazu gehören Polymorphismen in Genen, die akzessorische Moleküle, Zytokine oder Zytokinrezeptoren kodieren (88, 89), oder der HLA-Typ des Wirtsorganismus (90).

Eine frühe Th1-Antwort, die gegen multiple Epitope gerichtet ist, führt am ehesten zu einer Viruselimination (91). Bei Patienten, bei denen eine spontane HCV-Elimination gelungen ist, wurde nach Stimulation mit viralen Proteinen eine Proliferation von CD4 T-Zellen nachgewiesen. Dabei wurden besonders robuste T-Zell-Antworten gegen die HCV-Proteine Core, NS3, NS4 und NS5 generiert. Bei Patienten, bei denen die Infektion spontan ausheilte, wurden Immunantworten gegen zahlreiche (durchschnittlich 10) HCV-Epitope gebildet, während bei Patienten, die einen chronischen Verlauf aufwiesen, nie mehr als ein Epitop erkannt wurde (92). In einer anderen Studie wurde bei allen Patienten, die das Virus spontan eliminierten, eine Immunantwort gegen das NS3-Protein gefunden, während sich eine solche nur bei 33% der Patienten, die eine chronische Infektion entwickelten, und bei 8% der Patienten mit bereits bestehender chronischer Hepatitis (93) ausbildete. Diese Ergebnisse wurden in weiteren Studien bestätigt: Die T-Zell-Reaktivität gegen Oberflächen- und Nichtstrukturproteine bei Patienten mit spontaner Viruselimination war im Vergleich zur chronischen Verlaufsform signifikant höher (94). Die enge zeitliche Korrelation zwischen Nachweis bzw. Verlust einer HCV spezifischen CD4 T-Zellantwort und dem Verschwinden bzw. Wiederauftreten der Hepatitis C Virämie spricht für die entscheidende Rolle der CD4 T-Zell vermittelten Immunreaktion bei der Kontrolle der HCV-Infektion (95). Die protektive T-Helfer-Antwort scheint sich dabei vor allem gegen Epitope des NS3-Proteins zu richten (96, 97). Nach akuter Infektion erreichte die Aktivität der CD4 T-Zellen ihr Maximum unmittelbar

nach Erkrankungsbeginn, während die Reaktivität der CD8 T-Zellen zunächst unterdrückt war und erst nach ca. 10 Wochen ihr Maximum erreichte. Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurden keine nennenswerten CD8 T-Zell Antworten gegen virale Epitope beobachtet (98). Eine robuste CD8 T-Zell Antwort ist hingegen mit der Elimination des Virus assoziiert (99). Ähnlich wie bei der CD4 T-Zell Antwort war die Anzahl der Epitope, die durch zytotoxische CD8 T-Zellen erkannt wurden, ein Prädiktor für eine erfolgreiche Viruselimination (100). Unter der Therapie mit IFN- α kam es zu einer Vermehrung der T-Zell Antworten gegen virale Proteine (101), was bei einer Vielzahl von Patienten schließlich zur Viruselimination führte.

2.2.1. Beeinflussung der T-Zell Antwort gegen HCV durch CTLA4 (P5)

Kostimulatorische Faktoren sind entscheidend für die Ausbildung einer effektiven Immunantwort. Dieses sogenannte „zweite Signal“ wird durch kostimulatorische Signale wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) vermittelt, die an den Rezeptor CD28 auf T-Zellen binden und so zu einer vollständigen Aktivierung beitragen (102). Sind T-Zellen bereits aktiviert, muß eine negative Gegenregulation erfolgen, um ein Überschießen der Immunantwort zu verhindern. Diese Gegenregulation erfolgt unter anderem durch die Expression des Rezeptors CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) auf aktivierten T-Zellen. CTLA4 bindet ebenfalls kostimulatorische Faktoren, führt jedoch zu einer Abschwächung der T-Zell Aktivität (103, 104). Im Tiermodell wird anschaulich, wie wichtig diese Gegenregulation ist: Das Fehlen von CTLA4 führt zu einer generalisierten Autoimmunerkrankung (30, 105). CTLA4 wird außerdem auf regulatorischen T-Zellen exprimiert und ist essentiell für ihre supprimierende Wirkung (106-109). Im *CTLA4* Gen wurden mehrere genetische Variationen beschrieben, die mit dem Auftreten autoimmuner Erkrankungen assoziiert sind. Dazu gehören die autoimmune Thyreoiditis (110), der systemische Lupus erythematodes (111) und der Typ I Diabetes (110, 112). Eine englische Arbeitsgruppe berichtete auch über die Assoziation einer genetischen Variation mit autoimmunen Lebererkrankungen, nämlich mit der autoimmunen Hepatitis (113) und der primär biliären Zirrhose (114, 115). Im Gegensatz dazu fanden eine französisch/kanadische (116) und eine brasilianische Arbeitsgruppe (117) eine umgekehrte bzw. keine Assoziation mit der autoimmunen Hepatitis.

Mittlerweile sind mehrere CTLA4 Variationen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) bekannt (110): Die zwei am besten charakterisierten sind der -318C>T SNP im Promoterbereich (118) und der +49A>G SNP im ersten Exon (119). Funktionell scheint den

Autoimmunphänomenen bei Trägern des +49A>G Polymorphismus sowohl eine verminderte Anzahl (120) als auch eine abgeschwächte Funktion regulatorischer T-Zellen (121) zugrunde zu liegen. Die funktionelle Auswirkung des -318C>T Polymorphismus ist weniger gut charakterisiert. Ein einzelner Bericht spricht für eine vermehrte Expression von CTLA4 auf aktivierten T-Lymphozyten von -318C>T Trägern (122). Die Funktionen von CTLA4 im Rahmen einer Immunantwort sind allerdings komplex, und die Bindung von CTLA4 kann sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Inhibition führen, je nachdem mit welcher Stärke und auf welchen Zelltypen CTLA4 exprimiert wird (123). Daher ist die Auswirkung einer *CTLA4* Variation in einem spezifischen Krankheitszusammenhang nicht unbedingt vorherzusehen.

Eine Variation, die zu einer vermehrten Aktivität des Immunsystems führt, kann zu Autoimmunerkrankungen auslösen, sie kann zum anderen aber im Rahmen einer Infektion möglicherweise zu einer verbesserten Infektabwehr führen. Tatsächlich liegen Berichte über eine Assoziation von *CTLA4* Variationen mit der Ausheilung der akuten HBV-Infektion (124) und dem Ansprechen auf eine Therapie bei der chronischen HCV-Infektion (125) vor.

In früheren Studien wurde ein Einfluß einer Reihe genetischer Variationen auf das Therapieansprechen bei der chronischen HCV-Infektion beschrieben. Hier sind vor allem die Polymorphismen der *IL10* (126), *IL12B* (127), *RANTES* (128), *G Protein $\beta 3$* (129) und *MxA* (89) Gene zu nennen. In einer kleinen Studie wurde außerdem eine Assoziation des *CTLA4* -318C+49G Haplotyps mit einem günstigen Therapieansprechen nachgewiesen (125). Wir untersuchten daher die Bedeutung von *CTLA4* Variationen bei der HCV-Infektion in unserer, - wesentlich größeren - Kohorte. Dazu wurden die beiden *CTLA4* SNPs bei 127 Patienten untersucht, bei denen eine HCV-Infektion spontan ausgeheilt war, außerdem bei 947 Patienten mit chronischer HCV-Infektion und bei 200 gesunden Kontrollen. Zusätzlich zur Analyse der Allelhäufigkeiten wurden die *CTLA4* Haplotypen berechnet. Dabei wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen und im Vergleich zu Patienten mit chronischer Infektion eine Häufung des -318C+49A Haplotyps bei männlichen Individuen festgestellt, bei denen die HCV-Infektion spontan ausgeheilt war. Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion hatten *CTLA4* SNPs keinen Einfluß auf die Fibroseprogression, waren jedoch prädiktiv für das Therapieansprechen auf eine Interferon- α basierte Therapie. Bei männlichen Patienten zeigte sich ein schlechteres Therapieansprechen, wenn Individuen den -318C+49A Haplotyp aufwiesen. Dieser Unterschied war umso ausgeprägter, je größer die therapeutische Herausforderung war: Besonders große Unterschiede zeigten sich bei Patienten, die mit den schwierig zu behandelnden HCV Genotypen 1 und 4 infiziert waren oder mit der weniger

effizienten Interferon- α Monotherapie behandelt wurden. Eine multivariate Analyse bestätigte den Einfluß des *CTLA4* Haplotyps auf das Therapieansprechen. Außerdem beeinflussten der HCV-Genotyp, das Ausmaß der Leberfibrose und die Art der Therapie das Therapieansprechen (P5). Eine wesentliche Erkenntnis dieser Studie war neben der Bedeutung von CTLA4 für die Immunreaktion gegen HCV die Geschlechtsspezifität der Ergebnisse. Die hierfür verantwortlichen Faktoren sind nicht bekannt, aber es ist möglich, daß die Kodierung immunrelevanter Gene auf dem X-Chromosom oder Unregelmäßigkeiten bei der Inaktivierung eines X-Chromosoms bei Frauen hierfür verantwortlich sind (130, 131). Die beobachteten Unterschiede sind insofern von Interesse, als zum einen das Geschlecht einen Einfluß auf das Therapieansprechen bei der HCV-Infektion aufweist (132), zum anderen das Geschlecht einen Einfluß auf die Funktion regulatorischer T-Zellen hat (133), die wiederum von der Funktion des Rezeptors CTLA4 abhängig sind.

Eigene Publikation:

P5 Schott E, Witt H, Hinrichsen H, Neumann K, Weich V, Bergk A, Halangk J, Muller T, Tinjala S, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Berg T. Gender-dependent association of CTLA4 polymorphisms with resolution of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2007 Mar;46(3):372-80. URL: PM: 17150279

Schott E, Witt H, Hinrichsen H, Neumann K, Weich V, Bergk A, Halangk J, Müller T, Tinjala S, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Berg T.
Gender-dependent association of CTLA4 polymorphisms with resolution of hepatitis C virus infection.
J Hepatol. 2007 Mar;46(3):372-80. Epub 2006 Nov 2.
PMID: 17150279

2.2.2. Die Bedeutung des Toll-like Rezeptor 7 für die T-zelluläre Immunität gegen HCV (P6, P7)

Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren auf dendritischen Zellen (DC) führt u. a. zur Freisetzung der Zytokine IFN- α und IFN- β sowie der Interleukine IL-6 und IL-12. Diese Zytokine bewirken eine weitere Reifung der DC und induzieren Th1-Effektorfunktionen in T-Zellen (134). Im menschlichen Blut finden sich zwei Untergruppen von DC: Myeloide DC (MDC), die durch die Expression von CD11c gekennzeichnet sind, und plasmazytoide DC (PDC), die kein CD11c, stattdessen jedoch den IL-3 Rezeptor CD123 exprimieren (135). Beide Subpopulationen exprimieren auch ein unterschiedliches Repertoire an TLR: MDC exprimieren TLR4 und TLR7, während PDC TLR9 und TLR7 exprimieren (136). Werden MDC durch Bindung von LPS an TLR4 aktiviert, produzieren sie in erster Linie IL-12, während PDC nach Stimulation von TLR9 durch CpG-DNA bevorzugt IFN- α produzieren (136). IFN- α spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen. Daher spielen PDC aufgrund ihres Potentials, große Mengen dieses Zytokins zu synthetisieren, eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung einer antiviralen Immunantwort. Die Mechanismen, die zur Aktivierung von PDC führen, etwa die Aktivierung über TLR, sind deshalb von zentralem Interesse.

TLR7 und TLR8 wurden im Jahr 2000 identifiziert (137). Die Gene, die für diese beiden TLR kodieren, befinden sich auf dem X-Chromosom. Die genetische Information ist jeweils auf drei Exone verteilt, wobei in beiden Fällen Exon 1 die 5'-untranslatierte Region und Exon 2 lediglich das Startcodon enthalten.

Eine Reihe immunmodulatorischer Substanzen (Imidazolidine bzw. Nukleosidanaloga), die schon seit Jahren in der antiviralen und antineoplastischen Therapie eingesetzt werden, wirken über eine Aktivierung von TLR7 und TLR8 (138-142) und führen MyD88-abhängig zur Aktivierung und Reifung von DCs mit konsekutiver Zytokinfreisetzung (139). TLR7 Agonisten spielen nicht nur eine Rolle bei der Behandlung lokaler viraler Infektionen wie der Papillomavirus Infektion (143), sondern können auch eine antitumoröse Immunantwort verstärken (144). Die strukturelle Verwandtschaft dieser Substanzen mit den Bausteinen der DNA bzw. RNA legt nahe, daß Bestandteile der viralen oder bakteriellen Erbsubstanz natürliche Liganden für TLR7 und TLR8 sein könnten. Tatsächlich wurde vor kurzem virale Einzelstrang-RNA als natürlicher Ligand der TLR7 und 8 beschrieben (145, 146). Außerdem binden beim systemischen Lupus erythematodes RNA-assoziierte Antigene an TLR7 (147).

HCV ist ein RNA-Virus, so daß eine Bedeutung von TLR7 im Rahmen der angeborenen Immunantwort gegen die HCV-Infektion wahrscheinlich ist. Da die Aktivierung von TLR7 zur Freisetzung von Interferon- α führt und Interferon- α eine Schlüsselrolle bei der Behandlung der HCV-Infektion darstellt, liegt es nahe, den Einsatz von TLR7 Agonisten bei der chronischen HCV-Infektion zu untersuchen. Das ist insofern von klinischer Bedeutung, als die zurzeit standardmäßig durchgeführte Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon- α und Ribavirin nur bei ca. 60% aller Patienten zum dauerhaften Therapieansprechen führt und von erheblichen Nebenwirkungen begleitet wird, die nicht selten zum Abbruch der Therapie zwingen. Wir haben im Rahmen einer klinischen Studie die Sicherheit und Tolerabilität sowie die Wirksamkeit der Stimulation des TLR7 bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion untersucht (P6). Isatoribin ist ein selektiver TLR7 Agonist, der *in vitro* keine direkte antivirale Wirkung aufweist (148), aber durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems in einer Reihe von Tiermodellen viraler Erkrankungen wirksam war (149-151).

Um die Wirksamkeit von Isatoribin bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion zu überprüfen, wurden insgesamt 32 Patienten intravenös mit Isatoribin in einer Dosis von 200 mg ($n=4$), 400 mg ($n=4$), 600 mg ($n=5$) oder 800 mg ($n=12$) einmal täglich oder mit 400 mg zweimal täglich ($n=3$) für die Dauer von 7 Tagen behandelt. In einer weiteren Gruppe erfolgte die Gabe von 800 mg dreimal pro Woche für die Dauer von 14 Tagen ($n=4$). Die Viruslast reduzierte sich während der Therapie dosisabhängig: Bei 8 von 12 Patienten in der 800 mg Dosisgruppe sank die Viruslast um mehr als 0.5 log. Die Effekte in der Gruppe, die Isatoribin dreimal pro Woche erhielt, waren deutlich weniger ausgeprägt. Des Weiteren wurde ein dosisabhängiger Anstieg der 2'5' Oligoadenylat Synthetase Aktivität und des ISG15 (Interferon-stimulated gen 15), die durch Interferon induziert werden (152, 153), im Blut nachgewiesen. Das Medikament wurde gut toleriert, es kam zu keinen schweren unerwünschten Wirkungen. Während der Therapie kam es zu vorübergehenden Blutbildveränderungen. Es wurde eine leichte Verminderung der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten beobachtet, wie sie auch unter einer Therapie mit Interferon auftritt.

Da im Rahmen dieser klinischen Studie ein sehr unterschiedliches individuelles Ansprechen auf die Substanz beobachtet wurde, untersuchten wir, ob genetische Variationen im *TLR7* Gen bestehen, die einen Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung oder das Ansprechen auf eine Interferon- α basierte Therapie bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion haben. Für eine Reihe von TLR wurden bereits genetische Polymorphismen beschrieben, die mit dem Auftreten infektiöser Erkrankungen assoziiert sind: *TLR2* Variationen sind mit Gram-

positiven Infektionen (154), *TLR4* Polymorphismen mit Gram-negativen Infektionen (155-158) und *TLR5* Variationen mit dem Auftreten der Legionärskrankheit assoziiert (159). Für *TLR7* waren bislang noch keine SNPs beschrieben. Daher führten wir zunächst eine Sequenzanalyse des *TLR7* Locus bei 52 Patientinnen mit unterschiedlichen Lebererkrankungen durch um zu untersuchen, welche *TLR7* SNPs in unserer Population relevant sind. Es wurden zunächst nur Patientinnen ausgewählt, da sich das *TLR7* Gen auf dem X-Chromosom befindet und so durch die Untersuchung von Frauen insgesamt 104 Allele untersucht werden konnten. Es fanden sich 5 Variationen im *TLR7* Gen, von denen 3 mit einer Häufigkeit von mehr als 5% vorkamen. Davon befand sich eine (c.1-120T>G) im ersten Intron, eine weitere (c.32A>T) führte zu einem Aminosäureaustausch (Q>L), und die dritte Variation (c.2403G>A) war stumm.

Die Leberschädigung bei der HCV-Infektion ist nicht durch einen zytopathischen Effekt des Virus bedingt, sondern entsteht durch die Aktivität des Immunsystems, die befallene Hepatozyten lysiert, ohne jedoch zu einer vollständigen Ausheilung zu führen. Daher ist anzunehmen, daß genetische Veränderungen, die einen Einfluß auf die Aktivierung des Immunsystems haben, nicht nur das Stadium der Entzündung, sondern auch den Grad der Fibrose beeinflussen.

Eine Reihe genetischer Variationen ist mit dem Fibrosestadium bei der chronischen HCV-Infektion assoziiert, darunter solche in den Genen für HFE (160), TGF- β (161), Komplement Faktor-5 (162), Angiotensinogen (163), MCP-1 (164) und mikrosomale Epoxid Hydrolase (165).

Um den Einfluß von *TLR7* Variationen auf die Fibroseprogression zu untersuchen, wurden die Polymorphismen c.1-120T>G, c.32A>G und c.2403G>A in einer Kohorte von 807 Patienten mit chronischer HCV-Infektion untersucht, von denen histologische Daten vorlagen. Es wurde eine signifikante Häufung des c.1-120T>G Polymorphismus bei männlichen Patienten beobachtet, die eine weniger ausgeprägte Entzündungsaktivität oder ein niedrigeres Fibrosestadium aufwiesen. Die Analyse der Haplotypen bestätigte die unterschiedliche Verteilung bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung und dem Stadium der Fibrose. Da der Fibrosegrad abhängig von der Dauer der Erkrankung ist, wurde zusätzlich der Einfluß des Patientenalters als Surrogatmarker für die Dauer der Infektion untersucht. In der multivariaten Analyse war die c.1-120T>G Variation ein unabhängiger Prognosefaktor für eine milde Entzündung oder geringe Fibrose (P7).

In unseren Untersuchungen wurde wiederum eine Geschlechtsspezifität der Assoziation festgestellt. Dieser Befund ist insofern nicht überraschend, als daß *TLR7* X-chromosomal lokalisiert ist. Das führt dazu, daß Variationen doppelt so häufig bei Frauen auftreten wie bei Männern, in aller Regel aber in Heterozygotie vorliegen, so daß rezessive Mutationen bei Frauen nur selten phänotypisch wirksam werden. Im Gegensatz dazu sind Variationen bei Männern seltener, treten aber stets hemizygot auf, was zur Ausprägung eines Phänotyps auch bei rezessiven Variationen führt. Umgekehrt führt eine dominante Variation bei Frauen doppelt so häufig zur Ausbildung eines Phänotyps wie bei Männern. Die Geschlechtsspezifität ist auch insofern von Bedeutung, als geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Sekretion von Interferon- α nach TLR7 Stimulation bestehen (166).

Zusammengefasst sprechen unsere Daten für eine Rolle des TLR7 bei der Immunantwort gegen HCV. Die Analyse von *TLR7* Polymorphismen, ggf. in Kombination mit anderen genetischen Variationen wie den oben beschriebenen *CTLA4* SNPs, kann möglicherweise helfen, Individuen zu identifizieren, die ein größeres Risiko aufweisen, einen progredienten Verlauf der Erkrankung zu erleiden oder ein ungünstiges Therapieansprechen zu zeigen. Anhand solcher individueller genetischer Risikoprofile könnten dann individuelle Therapieschemata entwickelt werden, die z.B. eine längere Therapiedauer für Patienten mit hohem Rückfallrisiko vorsehen.

Eigene Publikationen:

P6 Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*. 2005 Sep;42(3):724-31. URL: PM: 16116638

P7 Schott E, Witt H, Neumann K, Weich V, Halangk J, Bergk A, Wiedenmann B, Berg T. A single nucleotide polymorphism in the TLR7 gene is associated with grade of inflammation and stage of fibrosis in patients with chronic HCV infection. *J. Hepatology*. 2007. Im Druck.

Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR.
Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection.
Hepatology. 2005 Sep;42(3):724-31.
PMID: 16116638

Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halangk J, Weich V, Wiedenmann B, Berg T.
A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection.
J Hepatol. 2007 Aug;47(2):203-11. Epub 2007 Apr 12.
PMID: 17512627

2.3. T-zelluläre Immunität bei autoimmunen Lebererkrankungen (P8)

Obwohl die Leber ein tolerogenes Organ ist, entstehen in diesem Organ Autoimmunerkrankungen. Dabei können sowohl Hepatozyten im Rahmen einer autoimmunen Hepatitis als auch Cholangiozyten im Rahmen einer autoimmunen Cholangitis (primär biliäre Zirrhose und primär sklerosierende Cholangitis) die Zielzellen der Immunreaktion sein. Ätiologie und Pathogenese der autoimmunen Lebererkrankungen sind nur unvollständig untersucht, vieles spricht jedoch dafür, daß eine Kreuzreaktion des Immunsystems mit körpereigenen Proteinen zugrunde liegt. Da bei den Erkrankungen klinische Symptome erst während fortgeschrittener Erkrankungsphasen auftreten, ist es schwierig, die frühen Stadien der Erkrankungen und damit die ersten Ereignisse bei der Entstehung zu beobachten. Tiermodelle würden ermöglichen, gezielt die frühen Phasen der Krankheitsentstehung zu analysieren.

Die Untersuchung von Vorgängen der Antigenpräsentation in der Leber ist bislang nahezu ausschließlich im Kontext einer Alloreaktion erfolgt. Dazu wurde ein fremdes MHC-I Molekül auf Hepatozyten exprimiert, der Transfer T-Zell Rezeptor transgener T-Zellen führt dann zur Aktivierung der T-Zellen durch die Hepatozyten (167, 168). Diese Modelle erlauben jedoch nicht die Untersuchung der Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch professionelle APC, wie sie bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen vorkommt, da das fremde MHC-I Molekül nicht auf APC exprimiert wird. Untersuchungen in diesen Modellen haben gezeigt, daß Hepatozyten zwar in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren, daß diese jedoch einen inkomplett aktivierten Phänotyp aufweisen und frühzeitig apoptotisch werden. Die Ergebnisse in den verwendeten Modellen waren jedoch widersprüchlich (167-174), und neuere Daten sprechen für eine vollständige Aktivierung von CD8 T-Zellen in der Leber, ohne daß aber definiert werden konnte, welche Antigen-präsentierenden Zellen verantwortlich für den beobachteten Effekt sind (174). Das von uns entwickelte Tiermodell basiert auf der transgenen Expression eines nicht-MHC Antigens in der Leber, so daß seine Präsentation sowohl durch die Zielzellen als auch durch professionelle APC erfolgt. Dadurch ist eine Differenzierung des Beitrags verschiedener Populationen Antigen-präsentierender Zellen bei der Entstehung von Autoimmunität und Toleranz in der Leber möglich. Durch Expression des Modellantigens Ovalbumin in Hepatozyten oder Cholangiozyten wurden Mauslinien geschaffen, an denen die initialen pathogenetischen Mechanismen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen der Leber untersucht werden können. Ovalbumin wird unter der Kontrolle des Transferrin (TFR)-Promotors in Hepatozyten oder des apical sodium-dependent bile transporter (ASBT)-Promotors in Cholangiozyten exprimiert.

Zunächst wurden die transgenen Mauslinien phänotypisch charakterisiert, und die Präsentation und Kreuzpräsentation von Ovalbumin in der Leber wurde untersucht. Die Expression des Transgens auf Proteinebene wurde ausschließlich in der Leber nachgewiesen. Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens naiver T-Zellen wurden aufgereinigte T-Zell Rezeptor transgene CD8 (OT-I) T-Zellen in TFR-OVA oder ASBT-OVA Mäuse transferiert. CD8 T-Zellen migrierten fast ausschließlich in die Leber von TFR-OVA Mäusen, während sich bei ASBT-OVA Mäusen zwar eine Präferenz für die Leber zeigte, jedoch auch Zellen in anderen lymphatischen Organen nachgewiesen wurden. Das Proliferationsverhalten der T-Zellen wurde nach CFSE-Markierung analysiert. CD8 T-Zellen proliferierten in der Leber von TFR-OVA Mäusen, während sich in ASBT-OVA Mäusen eine Proliferation sowohl in der Leber als auch in den leberdrainierenden Lymphknoten fand. Die Untersuchung der Serum-ALT erfolgte im Zeitverlauf zum Nachweis einer Entzündung der Leber. Der Transfer antigenspezifischer CD8 T-Zellen führte bei beiden Mauslinien zu einem transienten Anstieg der Serum-ALT, allerdings trat der Gipfel bei ASBT-OVA Mäusen geringfügig früher auf, und das Ausmaß des Anstiegs war wesentlich geringer als bei TFR-OVA Mäusen. Zeitgleich trat ein Infiltrat der Leber durch antigenspezifische CD8 T-Zellen auf. Der Transfer von CD8 T-Zellen führte erst ab einer Schwelle von 4 Mio. CD8 T-Zellen zur Entwicklung eines portalen Infiltrates in ASBT-OVA Mäusen, während sich in TFR-OVA Mäusen ein portales und lobuläres Infiltrat entwickelte.

Um den Anteil verschiedener Populationen Antigen-präsentierender Zellen an der Aktivierung von CD8 T-Zellen durch Leberantigene zu ermitteln, wurden Knochenmarkchimären hergestellt, deren professionelle APC nicht in der Lage sind, das Antigen Ovalbumin zu präsentieren. In diesen Mäusen wurde, gemessen am Proliferationsverhalten, unverändert eine Aktivierung von CD8 T-Zellen in der Leber beobachtet. Allerdings waren diese CD8 T-Zellen nicht mehr in der Lage, Hepatozyten zu attackieren: Der Anstieg der Serum-ALT blieb aus. Damit wurde eindeutig gezeigt, daß knochenmarkabhängige professionelle APC notwendig sind, um CD8 T-Zellen so zu aktivieren, daß sie eine vollständige Effektorfunktion aufnehmen. Um weiterhin zu untersuchen, wo die Antigen-präsentierende Zellpopulation lokalisiert ist, wurden Mäuse splenektomiert und zusätzlich vor dem Zelltransfer mit einem anti-CD62L Antikörper behandelt, der den Eintritt naiver T-Zellen in Lymphknoten weitgehend verhindert (175). In diesen Mäusen wurde wiederum unverändert eine Proliferation der transgenen T-Zellen in der Leber festgestellt. Der Anstieg der Serum-ALT war im Vergleich zu Kontrollmäusen nicht

vermindert. Dieser Versuch belegt, daß professionelle APC in der Leber in der Lage sind, T-Zellen vollständig zu aktivieren (P8).

Zusammengefasst wurde durch diese Versuche demonstriert, daß Antigene, die in Hepatozyten oder Cholangiozyten exprimiert werden, differentiell präsentiert werden und daß professionelle APC notwendig sind, um eine vollständige T-Zell Aktivierung zu gewährleisten. Hierfür sind professionelle APC in der Leber ausreichend, es bedarf nicht zwingend der Aktivierung im drainierenden Lymphknoten.

Eigene Publikation:

P8 Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, Wiedenmann B, Ploegh HL, Schott E. Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. In Revision.

Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, Wiedenmann B, Ploegh HL, Schott E. Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology*. 2007 Oct;46(4):1155-65. PMID: 17657820

3. Diskussion

T-Zellen sind wichtige Effektoren des erworbenen Immunsystems. Zu ihren wesentlichen Eigenschaften gehört die hohe Variabilität ihrer T-Zell Rezeptoren: Die theoretische Anzahl verschiedener T-Zell Rezeptoren in einem Individuum beträgt ca. 10^{18} . Diese Diversität wird - ähnlich wie bei den Immunglobulinen - durch das Rearrangement der V-, D- und J-Segmente und das Hinzufügen von P- und N-Nukleotiden erzielt. Im Gegensatz zur weiteren Reifung der Immunglobuline im Verlauf einer Immunantwort findet nach Selektion von T-Zellen im Thymus kein wesentliches somatisches Rearrangement mehr statt (15), und eine Modifikation der T-Zell Spezifität ist nach Verlassen des Thymus nicht mehr möglich. Daher hat der Selektionsprozess im Thymus eine entscheidende Bedeutung: Zum einen muß eine hohe Diversität der T-Zell Spezifität gewährleistet werden, zum anderen dürfen keine autoreaktiven T-Zellen den Selektionsprozess überdauern. Im Thymus wird also zentrale Toleranz generiert. Eine entscheidende Frage im Bereich der T-Zell Immunität ist, wie es gelingen kann, T-Zellen mit Reaktivität gegen eine Vielzahl von Antigenen zu generieren, die während der Selektion nicht vorhanden sind, gleichzeitig aber T-Zellen mit Reaktivität gegen Selbst-Antigene zu eliminieren. Die Mehrzahl der durch zufälliges Rearrangement des TCR entstandenen Thymozyten ist nutzlos, da ihr TCR nicht mit endogenen MHC Molekülen interagieren kann. Deshalb ist ein positiver Selektionsschritt für diejenigen T-Zellen notwendig, die mit endogenem MHC reagieren. Natürlich kommt es dadurch auch zur Anreicherung autoreaktiver T-Zellen, die wiederum in einem negativen Selektionsschritt eliminiert werden müssen. Es werden verschiedene Mechanismen der negativen Selektion diskutiert, darunter klonale Deletion (176), Induktion von Anergie (177) und Editierung des T-Zell Rezeptors (178, 179). Die Mechanismen der positiven und negativen Selektion werden in der Regel in transgenen Mäusen untersucht, die einen spezifischen TCR exprimieren. Diese Modelle sind nicht unproblematisch, da die Expression des transgenen TCR während der Reifung der Thymozyten unphysiologisch früh auftritt. Üblicherweise erfolgt zunächst die Expression der β -Kette des TCR, die sich im $CD4^+CD8^-$ (DN) Stadium der Entwicklung mit der prä-TCR α Kette paart. Erst im $CD4^+CD8^+$ (DP) Stadium erfolgt die Expression der rearrangierten TCR α Kette, die sich nun mit der TCR β Kette zum reifen TCR verbindet. In diesem Stadium erfolgen die Selektionsvorgänge. In TCR transgenen Mäusen erfolgt die Expression des transgenen TCR meist bereits im DN Stadium, so daß die Selektion zu früh erfolgt. Tatsächlich wurde durch die zeitlich begrenzte Expression transgener TCR-Ketten gezeigt, daß die negative Selektion im DN Stadium einen unphysiologischen Zustand darstellt (180). Aus diesen Daten lässt sich ableiten, daß klonale Deletion üblicherweise im späten DP

Stadium erfolgt. Das ist insofern wichtig, als die molekularen Mechanismen der Deletion in beiden Stadien vermutlich unterschiedlich sind (181) und der Ort der Deletion sich unterscheidet: DN und frühe DP Thymozyten halten sich im Kortex des Thymus auf, während späte DP und SP Thymozyten in die Medulla einwandern. Aus den o.g. Daten würde sich ableiten, daß medulläre - und nicht kortikale - Thymusepithelzellen die wichtigste Rolle bei der klonalen Deletion von Thymozyten spielen (182), während kortikale Epithelien positive Selektion vermitteln (183). In diesem Modell werden Thymozyten positiv selektiert, wenn sie Selbst-MHC erkennen. Daraufhin regulieren sie einen der beiden Korezeptoren herab und beginnen, CCR7 zu exprimieren, wodurch ihnen die Einwanderung in die Medulla gelingt (184). Dort interagieren sie mit medullären Epithelien, die - vermittelt durch den Transkriptionsfaktor AIRE - periphere Antigene exprimieren und präsentieren (185, 186). Hier werden Thymozyten depletiert, die Selbst-Antigene mit hoher Affinität erkennen. Außerdem spielen vermutlich knochenmarkabhängige APC eine Rolle bei der negativen Selektion (187).

Neben der Interaktion zwischen MHC/Peptid und TCR spielen auch zusätzliche Interaktionen eine Rolle, die die Avidität der Bindung verstärken, darunter solche mit Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen (61, 188).

Nicht jede Interaktion hoher Avidität im Thymus führt aber zur negativen Selektion: Regulatorische T-Zellen werden im Thymus durch Interaktionen mit hoher Avidität selektiert. Dazu gehören $CD4^+CD25^+$ regulatorische CD4 T-Zellen (189, 190), $CD8\alpha\alpha$ exprimierende intraepitheliale T-Lymphozyten (65, 191) und NKT-Zellen (192).

In unserem Modell wurden MHC-I defiziente Thymuskulturen verwendet, die mit rekombinanten MHC-I Molekülen von definierter Konzentration, definierter Bindungswalenz und definiertem Peptidliganden supplementiert wurden. In MHC-I defizienten Thymuskulturen vermittelte die alleinige Interaktion mit den rekombinanten MHC-I Molekülen ein Signal, aus dem positive Selektion resultierte. Eine monovalente Interaktion war ausreichend, um positive Selektion auszulösen, und eine gleichzeitige Bindung von CD8 an das MHC-I Molekül war nicht notwendig. In MHC-I positiven Kulturen führte die Zugabe von Agonist beladenen MHC-I Molekülen hingegen zur Depletion. Dieser Befund weist darauf hin, daß zusätzliche Signale durch endogene MHC-Moleküle zum integrierten Signal beitragen und so die Signalstärke über die für die klonale Depletion erforderliche Schwelle heben.

In dem von uns gewählten *in vitro* Modell der T-Zell Selektion wurden funktionelle CD8 T-Zellen also ausschließlich durch Interaktionen hoher Affinität selektiert. Dabei entwickelten sich sowohl CD8 $\alpha\alpha$ als auch CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen, aber nur CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen waren in der Lage, Interferon- γ zu produzieren. Beide Subpopulationen exprimierten Integrin $\alpha4\beta7$ und wanderten *in vivo* bevorzugt in die darmassoziierten lymphatischen Strukturen ein. Diese Zellen könnten sowohl regulatorische (193) als auch autoreaktive Eigenschaften haben (65).

Die Aktivierung reifer T-Zellen erfolgt - ebenso wie ihre Selektion - durch Interaktionen ihres T-Zell Rezeptors mit MHC Molekülen. Die Bindung der Korezeptoren CD4 und CD8 verstärkt das aktivierende Signal. Die Interaktion zwischen T-Zelle und B-Zelle erfolgt gerichtet im Sinne einer immunologischen Synapse (194-196), die auch als supramolekulares Aktivierungs-Cluster (SMAC) bezeichnet wird. In dieser Synapse wird der äußere Ring von LFA-1 gebildet, das mit ICAM-1 interagiert. Das Zentrum wird durch die TCR gebildet, die MHC binden. Außerdem befinden sich hier die Proteinkinase θ und die src Kinase lck. Allerdings scheinen Kontakte zwischen T-Zellen und DC kurz zu sein und nicht zur Ausbildung einer Synapse zu führen (197). Ebenso kommt es bei den Selektionsvorgängen im Thymus nicht zur Synapsenbildung (198).

Der exakte Mechanismus der T-Zell Aktivierung durch den TCR ist umstritten: Zwar kommt es bei der Bindung eines TCR an einen MHC/Peptid Komplex zu einer Konformationsänderung, doch ist unklar, ob diese auch zu einer Signaltransduktion führt (199, 200) oder sich auf die Bindungstaschen beschränkt, ohne die signalvermittelnden Anteile einzubeziehen (201-203). Die funktionelle Untersuchung der T-Zell Aktivierung kann in TCR transgenen Mäusen erfolgen, für deren TCR spezifische Peptidliganden bekannt sind. In diesen Modellen spricht eine Aktivierung durch monovalente Liganden für eine Konformationsänderung des TCR als Ursache der Aktivierung (51, 52), während eine Aktivierung allein durch multivalente Liganden für eine Aktivierung durch Vernetzung der TCR spricht (48-50).

Wir führten Experimente an OT-I transgenen Mäusen durch, deren CD8 T-Zellen durch mit dem Peptid SIINFEKL beladene MHC-I Moleküle aktiviert werden können. Dabei zeigte sich die Ursache für die unterschiedlichen Befunde anderer Gruppen: Das auf den MHC-I Molekülen gebundene Peptid ist nicht-kovalent gebunden und wird auf die CD8 T-Zellen übertragen, die selbst mit MHC-I Molekülen ausgestattet sind. Diese CD8 T-Zellen sind dann in der Lage, sich gegenseitig zu aktivieren, und die Effekte der rekombinanten MHC-I Moleküle werden verdeckt. Daher wurden MHC-I defiziente OT-I CD8 T-Zellen hergestellt.

Dies gelang durch die Übertragung von OT-I-MHC^{-/-} Knochenmark in RAG^{-/-} Mäuse. Die Empfänger stellen das MHC-I positive Thymusstroma zur Verfügung, das für die Selektion der CD8 T-Zellen notwendig ist, produzieren aber selbst keine T-Zellen. Die reifen OT-I MHC-I^{-/-} CD8 T-Zellen können dann aus den Lymphknoten der Empfängermäuse isoliert werden. Mit Hilfe dieser Zellen konnte nun in *in vitro* Experimenten definiert werden, daß multivalente Interaktionen und ein kostimulatorisches Signal notwendig sind, um eine Aktivierung von CD8 T-Zellen zu erzielen. Außerdem ist eine gleichzeitige Bindung des CD8 Korezeptors an das komplexierte MHC-I Molekül erforderlich. Diese Ergebnisse sprechen für eine Vernetzung von T-Zell Rezeptoren und gegen eine Konformationsänderung als entscheidenden Schritt bei der Aktivierung von T-Zellen.

Allerdings scheint die Zahl der MHC/Peptid Komplexe, die benötigt werden, um eine Immunantwort auszulösen, sehr klein zu sein. Schon ein einziges Antigen beladenes MHC Molekül reicht aus, um eine Aktivierung der T-Zelle zu erlauben (204, 205). Um dennoch eine Vernetzung von T-Zell Rezeptoren zu erreichen, müssen mit endogenen Peptiden beladene MHC Moleküle mit weiteren TCR interagieren. Diese Interaktion ist zwar von weitaus niedrigerer Affinität als diejenige mit dem antigenbeladenen MHC Molekül und würde alleine nicht zu einer Aktivierung führen; im Kontext der immunologischen Synapse, in der zusätzlich eine oder wenige spezifische Interaktionen bestehen, reicht sie jedoch aus, um eine Aktivierung zu ermöglichen (206). Damit wurde neben dem Monomer/Korezeptor-Modell (27), das eine MHC Monomer vermittelte Aktivierung bei gleichzeitiger Bindung eines TCR und eines CD8/CD4 Moleküls postuliert, und dem Dimerisierungs-Modell (207), das besagt, daß mehrere MHC Moleküle mehrere TCR binden müssen, ein drittes Modell etabliert. Dieses „Pseudodimerisierungs“-Modell postuliert, daß eine spezifische Interaktion zwischen Antigen/MHC und TCR zum einen und eine unspezifische Interaktion zwischen Selbst-Peptid/MHC und TCR zum anderen ausreichen, um eine T-Zell Aktivierung zu erlauben.

Im Gegensatz zu unseren Arbeiten mit MHC-I Tetrameren, die mit einer Mischung aus aktivierenden und inerten Peptiden beladen waren, und ähnlichen Befunden einer anderen Gruppe (208), zeigte eine kürzlich erschienene Arbeit einen positiven Effekt nicht-stimulierender MHC-I Moleküle in Hinblick auf die Aktivierung von CD8 T-Zellen (209).

Diese Ergebnisse lassen auch die Bedeutung von Selbst-Peptiden bei der Selektion im Thymus in einem neuen Licht erscheinen: Es ist möglich, daß schwach selbstreaktive T-Zellen selektiert werden, um eine unterstützende Rolle bei der Aktivierung durch Antigene zu

spielen, die in niedriger Dichte präsentiert werden (210). Unsere Arbeiten sprechen dafür, daß eine Pseudodimerisierung im Thymus eine Rolle bei der negativen Selektion spielt: Agonist beladene MHC-I Tetramere führten in MHC-I positiven Thymuskulturen zur negativen Selektion, während sie in MHC-I negativen Kulturen positive Selektion vermittelten.

Unsere Arbeiten an MHC-I^{-/-} Chimären ergaben einen weiteren Befund: MHC-I negative Thymozyten wurden von NK-Zellen attackiert und reiften nur aus, wenn sie einen alternativen Weg der T-Zell Entwicklung nahmen, der ohne wesentliche Proliferation auskommt. Erstaunlicherweise erreichten diese alternativen Vorläuferthymozyten das DP Stadium, ohne einen prä-TCR zu exprimieren und ohne CD25 herunterzuregulieren, was gegen einen Arrest spricht, wie er in p53-defizienten Mäusen beobachtet wird (211, 212). Die ausgereiften T-Zellen akkumulierten in den MHC-I positiven Mäusen, ohne von NK-Zellen attackiert zu werden, offensichtlich deshalb, weil sie nicht proliferierten und ihnen ein unbekannter NK-Zell aktivierender Faktor fehlte. Wurden die CD8 T-Zellen jedoch aktiviert, wurden sie wiederum Ziel eines Angriffs durch NK-Zell. Die Identität des putativen aktivierenden Liganden in diesem System ist unbekannt. Ein NKG2D-Ig Fusionsmolekül band nicht an proliferierende Thymozyten, was gegen eine Rolle von NKG2D-Liganden spricht. Alle bislang beschriebenen inhibierenden NK-Zell Liganden sind Mitglieder der MHC Familie. Da wir identische Effekte in MHC^{-/-}, TAP^{-/-} und β2m^{-/-} Mäusen beobachteten, ist das Fehlen eines inhibitorischen Liganden als Ursache des beobachteten Effekts unwahrscheinlich.

Re-Introduktion des H2-K^b Moleküls in Thymozyten mittels Gentransfer führte zur Wiederherstellung einer regelrechten T-Zell Entwicklung, während das H2-D^b Molekül keinerlei Effekt zeigte, eine Tatsache, die möglicherweise mit der Bindung verschiedener Ly49 Allele zusammenhängt (213). Da die Expressionsstärke von MHC-I während der T-Zell Selektion reguliert wird, ist es möglich, daß NK-Zellen bei der Regulation der Größe eines Thymozyten-Klons auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen.

Neben der im Thymus vermittelten zentralen Toleranz besteht auch periphere Toleranz, die im Wesentlichen durch verschiedene Populationen regulatorischer T-Zellen vermittelt wird. CTLA4 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz. Es ist essentiell für die Funktion regulatorischer T-Zellen und bewirkt eine negative Regulation der Funktionen aktivierter T-Zellen. Fehlt CTLA4, so kommt es bei Mäusen zu profusen autoimmunen Phänomenen, die durch eine unkontrollierte T-Zell Proliferation ausgelöst werden (105).

Single nucleotide Polymorphismen (SNP) sind häufige genetische Variationen, die die Funktion der betroffenen Moleküle wesentlich verändern können. Der Austausch einer einzelnen Base kann zum Austausch einer Aminosäure, zum Kettenabbruch oder zu verändertem Splicing führen. Aber auch SNP, die zu keiner dieser Veränderungen führen, können mit bestimmten Eigenschaften assoziiert sein, z.B. weil sie in einem Haplotyp mit einem anderen Polymorphismus vorliegen, der einen funktionellen Effekt hat. Genetische Studien, die SNPs untersuchen, sind häufig dadurch erschwert, daß bestimmte Allele in verschiedenen Populationen mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen, was eine Analyse der Ethnizitäten bei der Evaluierung von SNPs erforderlich macht. Außerdem sind genetische Variationen häufig wenig prävalent, so daß große Patientenkollektive untersucht werden müssen, um einen statistisch relevanten Effekt zu erkennen. Umgekehrt begünstigen kleine Kohorten das zufällige Auftreten von Assoziationen, die sich in größeren Kohorten nicht reproduzieren lassen.

Wir untersuchten zwei verschiedene genetische Polymorphismen, die möglicherweise die T-zelluläre Immunität verändern, bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion. *CTLA4* wurde ausgewählt, weil sowohl Berichte über die Assoziation von *CTLA4* SNPs mit autoimmunen Erkrankungen (110-115, 214) als auch über die umgekehrte Assoziation mit infektiösen Erkrankungen (124, 125) vorliegen. Es scheint also, daß genetische Variationen, die die Suszeptibilität gegenüber autoimmunen Erkrankungen erhöhen, gleichzeitig einen protektiven Effekt im Kontext von Infektionserkrankungen aufweisen. Zudem wurde beschrieben, daß bei chronisch mit HCV infizierten Patienten vermehrt HCV-spezifische regulatorische T-Zellen gefunden werden, die CD4 und CD8 T-Zellen supprimieren (215-218). Tatsächlich bestätigten unsere Arbeiten, daß ein *CTLA4* Polymorphismus mit dem Ansprechen auf die antivirale Therapie bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion assoziiert ist. Allerdings spielte der Effekt bei Patienten, die mit einer modernen effektiven Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon- α und Ribavirin behandelt wurden, eine untergeordnete Rolle und zeigte seinen stärksten Effekt bei Patienten, die die ungünstigsten Voraussetzungen für eine Heilung hatten: Patienten, die mit den schwierig zu therapierenden HCV Genotypen 1 und 4 infiziert waren und mit einer Interferon- α Monotherapie behandelt wurden, zeigten die stärkste Abhängigkeit vom *CTLA4* Genotyp. Es scheint also, daß genetische Faktoren weniger relevant sind, wenn eine effektivere Therapie gewählt wird. Die Veränderungen waren ausschließlich bei männlichen Patienten signifikant, während sich keine Assoziation bei Frauen zeigte. Die Gründe hierfür sind unbekannt, aber es ist möglich, daß Faktoren, die auf dem X-Chromosom kodiert werden, oder Mechanismen der Inaktivierung eines der X-

Chromosomen bei Frauen verantwortlich sind. Außerdem zeigen Frauen möglicherweise, unabhängig vom *CTLA4* Genotyp, ein besseres Therapieansprechen als Männer (132). Im Mausmodell haben regulatorische T-Zellen bei männlichen Mäusen einen stärker suppressierenden Effekt als bei weiblichen Mäusen, was insofern von Relevanz ist, als die Funktion regulatorischer T-Zellen von *CTLA4* abhängt.

Auch in unserer zweiten genetischen Studie wurde eine strenge Geschlechtsspezifität der Ergebnisse beobachtet. Ein Polymorphismus im *TLR7* Gen war mit den histologischen Veränderungen in der Leber bei männlichen Patienten mit chronischer HCV-Infektion assoziiert. Dabei waren entzündliche und fibrotische Veränderungen bei Patienten, die das variante Allel trugen, weniger stark ausgeprägt. Im Fall von *TLR7* überrascht eine Geschlechtsspezifität nicht, da der Rezeptor auf dem X-Chromosom kodiert ist und Variationen bei Männern stets in hemizygoter Form vorliegen, während homozygote Frauen äußerst selten sind. In einer aktuellen Studie fand sich nach Stimulation von *TLR7* eine höhere Interferon- α Produktion durch PDC, die aus dem Blut von Frauen isoliert wurden, als durch aus dem Blut von Männern isolierte PDC (166). Dieses Ergebnis ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß die Probanden nicht im Hinblick auf *TLR7* Polymorphismen untersucht wurden, die einen stärkeren Effekt bei Männern als bei Frauen zeigen könnten. Die funktionelle Auswirkung der *TLR7* Variation ist noch nicht abschließend geklärt, doch fand sich in unseren Pilotexperimenten eine vom Genotyp abhängige unterschiedliche Freisetzung von IL-6 nach Stimulation von PBMC mit dem *TLR7* Agonisten Imiquimod, nicht aber nach Stimulation mit dem *TLR4* Agonisten LPS.

Die Bedeutung von *TLR7* bei der HCV-Infektion zeigte sich auch in einer klinischen Studie, bei der chronisch mit HCV infizierte Patienten mit dem *TLR7* Agonisten Isatoribin behandelt wurden. Bei Patienten, die 800 mg Isatoribin pro Tag erhielten, wurde ein signifikanter Abfall der Viruslast beobachtet. Es ist bislang unbekannt, inwieweit *TLR7* Polymorphismen hierbei eine Rolle für ein individuell unterschiedliches Ansprechen spielen.

Im Gegensatz zur chronischen HCV-Infektion, bei der sich eine unzureichende Aktivierung von T-Zellen zeigt (85, 86, 92-94), finden sich bei autoimmunen Lebererkrankungen Hinweise auf eine vermehrte T-Zell Aktivität als Ursache der Inflammation. Das Entzündungsinfiltrat in der Leber von Patienten mit autoimmuner Hepatitis besteht im Wesentlichen aus T-Zellen, und die Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen spricht ebenfalls für eine T-Zell vermittelte Erkrankung (219, 220). Von den arzneimittelbedingten Formen der autoimmunen Hepatitis abgesehen ist die Ätiologie der autoimmunen Hepatitis

(AIH) nicht geklärt. Die bislang etablierten Tiermodelle der AIH beruhen in der Regel auf einer Alloreaktion von CD8 T-Zellen mit einem auf Hepatozyten exprimierten fremden MHC-I Molekül (167, 168). In diesem Modell wird das entsprechende Antigen jedoch nicht durch professionelle APC präsentiert. Die Reste abgestorbener Hepatozyten werden physiologischerweise von APC phagozytiert und im Kontext von MHC-II Molekülen präsentiert bzw. im Kontext von MHC-I Molekülen kreuzpräsentiert. Die Präsentation kann sowohl innerhalb der Leber durch dendritische Zellen, Kupffer-Zellen oder sinusoidale Endothelzellen als auch im leberdrainierenden Lymphknoten durch dendritische Zellen erfolgen. Wir etablierten ein Tiermodell, in dem das Modellantigen Ovalbumin in Hepatozyten oder Cholangiozyten exprimiert wird, um dieser natürlichen Situation so nahe wie möglich zu kommen. In diesem Modell zeigte sich eine unterschiedliche Präsentation bzw. Kreuzpräsentation je nachdem, ob das Antigen in Hepatozyten oder Cholangiozyten exprimiert wurde. Unsere Ergebnisse bestätigten Arbeiten anderer Gruppen dahingehend, daß die Expression von Antigen in der Leber zu einem Trapping der antigenspezifischen T-Zellen in der Leber und zu ihrer Aktivierung führt, die wiederum in einer transienten Hepatitis resultiert. Mit Hilfe des von uns entwickelten Modells konnte jedoch untersucht werden, welche APC verantwortlich für den beobachteten Effekt sind. Durch Splenektomie und Behandlung der Mäuse mit anti-CD62L Antikörper, der eine Einwanderung der T-Zellen in die Lymphknoten verhindert, wurde gezeigt, daß Milz und Lymphknoten nicht für eine Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind, daß also die Aktivierung in der Leber selbst erfolgt. Mit Hilfe von Knochenmarkchimären, in denen nur die nicht knochenmarkabhängigen Zellen das Antigen präsentieren können, wurde des weiteren nachgewiesen, daß professionelle APC erforderlich sind, um eine effektive T-Zell Aktivierung zu erzielen. Diese Ergebnisse führen die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen erstmals in dem Sinne weiter, daß nachgewiesen werden konnte, welche APC für die Aktivierung von CD8 T-Zellen durch ein in der Leber exprimiertes Antigen verantwortlich sind.

4. Zusammenfassung

T-Lymphozyten sind wichtige Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Ihre Aktivierung erfolgt durch die spezifische Interaktion ihres variablen T-Zell Rezeptors mit einem MHC Molekül, das mit einem Peptid beladen ist. Beim Aktivierungsvorgang spielen kostimulatorische Moleküle sowie die CD8 und CD4 Korezeptoren eine entscheidende Rolle. Die Selektion von T-Zellen im Thymus gewährleistet, daß nur solche T-Zellen in die Peripherie gelangen, die Selbst-MHC Moleküle erkennen können, jedoch nicht auf Selbst-Peptide reagieren, die auf diesen präsentiert werden. Eine unzureichende Selektion von T-Zellen im Thymus kann zu Autoimmunität, eine unzureichende Aktivierung in der Peripherie zu chronischen Infektionen führen.

Zunächst wurden die Mechanismen der Aktivierung und Selektion von T-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die multivalente Interaktion von MHC-I/Peptid-Komplexen mit T-Zell Rezeptoren und die gleichzeitige Bindung des CD8-Korezeptors für eine Aktivierung von CD8 T-Zellen notwendig sind. Umgekehrt reichte zur Selektion von Thymozyten eine monovalente Interaktion aus. Eine zusätzliche Bindung des CD8 Korezeptors war nicht notwendig. CD8 T-Zellen konnten durch den gleichen MHC-I/Peptid-Komplex selektiert und aktiviert werden, und die so generierten T-Zellen wanderten bevorzugt in den Darm. Hier sind sie möglicherweise an der Entstehung von Autoimmunität beteiligt.

Im nächsten Teil der Arbeiten wurden Pathomechanismen der T-Zell Funktion bei chronischen Hepatitiden untersucht. Der chronischen HCV-Infektion liegt eine unzureichende T-zelluläre Immunantwort zugrunde, die eine Eradikation des Virus verhindert. An der Regulation der Immunantwort sind aktivierende Faktoren wie der Toll-like Rezeptor 7 (TLR7) und hemmende Faktoren wie das Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) beteiligt. Genetische Variationen von *CTLA4* waren mit der spontanen oder therapiebedingten Ausheilung der Erkrankung assoziiert. Darüber hinaus beeinflussten TLR7 Variationen den natürlichen Verlauf der Erkrankung. Die Stimulation des TLR7 hatte einen antiviralen Effekt bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion.

Schließlich wurde die Bedeutung von T-Zellen bei autoimmunen Lebererkrankungen im Tiermodell untersucht. CD8 T-Zellen wurden durch professionelle, knochenmarkabhängige antigenpräsentierende Zellen stimuliert. Diese induzierten eine vollständige T-Zell Aktivierung, die zur Organschädigung führte. Die Aktivierung durch ein in Hepatozyten exprimiertes Antigen erfolgte vorwiegend in der Leber selbst, ein in Cholangiozyten exprimiertes Antigen wurde in der Leber und in den drainierenden Lymphknoten präsentiert.

5. Literaturverzeichnis

1. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9.
2. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-279.
3. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-983.
4. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
5. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000;12:20-26.
6. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-2088.
7. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999;64:429-435.
8. Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 2003;5:143-153.
9. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887-5894.
10. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies C, Mansell AS, Brady G. Mal(MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.
11. Kaisho T, Akira S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* 2003;3:373-385.
12. Boes M, Cerny J, Massol R, Op den Brouw M, Kirchhausen T, Chen J, Ploegh HL. T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 2002;418:983-988.
13. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-122.
14. Kurosawa Y, von Boehmer H, Haas W, Sakano H, Trauneker A, Tonegawa S. Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* 1981;290:565-570.
15. Zheng B, Xue W, Kelsoe G. Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature* 1994;372:556-559.
16. Sprent J. T and B memory cells. *Cell* 1994;76:315-322.
17. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992;175:305-308.
18. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiette B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106-109.
19. Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991;353:622-627.

20. Bai A, Forman J. The effect of the proteasome inhibitor lactacystin on the presentation of transporter associated with antigen processing (TAP)-dependent and TAP-independent peptide epitopes by class I molecules. *J Immunol* 1997;159:2139-2146.
21. Chapman HA. Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol* 1998;10:93-102.
22. Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1986;163:903-921.
23. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2260-2263.
24. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2264-2271.
25. Rocken M, Urban JF, Shevach EM. Infection breaks T-cell tolerance. *Nature* 1992;359:79-82.
26. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
27. Janeway CA, Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992;10:645-674.
28. Kersh EN, Shaw AS, Allen PM. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 1998;281:572-575.
29. Liu Y, Jones B, Brady W, Janeway CA, Jr., Linsley PS. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol* 1992;22:2855-2859.
30. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541-547.
31. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-773.
32. Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994;1:343-346.
33. Kuppers RC, Henney CS. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. *J Immunol* 1977;118:71-76.
34. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.
35. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
36. Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 2004;117:515-526.
37. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 1993;75:985-995.
38. Asnagli H, Murphy KM. Stability and commitment in T helper cell development. *Curr Opin Immunol* 2001;13:242-247.
39. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002;109:431-435.
40. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997;89:587-596.

41. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-669.
42. Krogsgaard M, Prado N, Adams EJ, He XL, Chow DC, Wilson DB, Garcia KC, et al. Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation. *Mol Cell* 2003;12:1367-1378.
43. Alam SM, Davies GM, Lin CM, Zal T, Nasholds W, Jameson SC, Hogquist KA, et al. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity* 1999;10:227-237.
44. Reich Z, Boniface JJ, Lyons DS, Borochoff N, Wachtel EJ, Davis MM. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Science* 1997;387:617-620.
45. Baker BM, Wiley DC. $\alpha\beta$ T cell receptor ligand-specific oligomerization revisited. *Immunity* 2001;14:681-692.
46. Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wulfing C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, et al. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity* 1998;9:459-466.
47. Cochran JR, Cameron TO, Stern LJ. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity* 2000;12:241-250.
48. Abastado JP, Lone YC, Casrouge A, Boulot G, Kourilsky P. Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J. Exp. Med.* 1995;182:439-447.
49. Daniels MA, Jameson SC. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J Exp Med* 2000;191:335-346.
50. Doucey MA, Legler DF, Boucheron N, Cerottini JC, Bron C, Luescher IF. CTL activation is induced by cross-linking of TCR/MHC-peptide-CD8/p56lck adducts in rafts. *Europ. J. Immunol.* 2001;31:1561-1570.
51. Block MS, Johnson AJ, Mendez-Fernandez Y, Pease LR. Monomeric class I molecules mediate TCR/CD3 ϵ /CD8 interaction on the surface of T cells. *J Immunol* 2001;167:821-826.
52. Delon J, Gregoire C, Malissen B, Darche S, Lemaitre F, Kourilsky P, Abastado JP, et al. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* 1998;9:467-473.
53. Bosselut R, Kubo S, Guinter T, Kopacz JL, Altman JD, Feigenbaum L, Singer A. Role of CD8 β domains in CD8 coreceptor function: importance for MHC I binding, signaling, and positive selection of CD8 $^+$ T cells in the thymus. *Immunity* 2000;12:409-418.
54. Renard V, Romero P, Vivier E, Malissen B, Luescher IF. CD8 β increases CD8 coreceptor function and participation in TCR- ligand binding. *J Exp Med* 1996;184:2439-2444.
55. Arcaro A, Gregoire C, Boucheron N, Stotz S, Palmer E, Malissen B, Luescher IF. Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J Immunol* 2000;165:2068-2076.
56. Thome M, Germanin V, DiSanto JP, Acuto O. The p56lck SH2 domain mediates recruitment of CD8/p56lck to the activated T cell receptor/CD3 ζ complex. *Eur. J. Immunol.* 1996;26:2093-2100.
57. Osono E, Sato N, Yokomuro K, Saizawa MK. Changes in arrangement and in conformation of molecular components of peripheral T-cell antigen receptor complex after ligand binding: analyses by co-precipitation profiles. *Scand J Immunol* 1997;45:487-493.
58. Suzuki S, Kupsch J, Eichmann K, Saizawa MK. Biochemical evidence of the physical association of the majority of CD3 δ chains with the accessory/co-receptor

- molecules CD4 and CD8 on nonactivated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992;22:2475-2479.
59. Anderson G, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 2001;1:31-40.
 60. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 1994;76:17-27.
 61. Amsen D, Kruisbeek AM. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev* 1998;165:209-229.
 62. Jameson SC, Bevan MJ. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* 1995;2:1-11.
 63. Hogquist KA, Jameson SC, Bevan MJ. Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8⁺ T cells. *Immunity* 1995;3:79-86.
 64. Ashton-Rickardt PG, Van Kaer L, Schumacher TN, Ploegh HL, Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8⁺ T cells in the thymus. *Cell* 1993;73:1041-1049.
 65. Leishman AJ, Gapin L, Capone M, Palmer E, MacDonald HR, Kronenberg M, Cheroutre H. Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 α CD8 α (+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* 2002;16:355-364.
 66. Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Yeung RS, Mak TW, Ohashi PS. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 1994;263:1615-1618.
 67. Cook JR, Wormstall EM, Hornell T, Russell J, Connolly JM, Hansen TH. Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo. *Immunity* 1997;7:233-241.
 68. Guehler SR, Bluestone JA, Barrett TA. Immune deviation of 2C transgenic intraepithelial lymphocytes in antigen-bearing hosts. *J Exp Med* 1996;184:493-503.
 69. Rocha B, von Boehmer H, Guy-Grand D. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 α / α co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5336-5340.
 70. Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. A unique subset of self-specific inraintestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 2002;195:1491-1497.
 71. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996;84:769-779.
 72. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675-678.
 73. Ljunggren HG, Karre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 1985;162:1745-1759.
 74. Storkus WJ, Howell DN, Salter RD, Dawson JR, Cresswell P. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 1987;138:1657-1659.
 75. Storkus WJ, Dawson JR. B cell sensitivity to natural killing: correlation with target cell stage of differentiation and state of activation. *J Immunol* 1986;136:1542-1547.
 76. Salcedo M, Andersson M, Lemieux S, Van Kaer L, Chambers BJ, Ljunggren HG. Fine tuning of natural killer cell specificity and maintenance of self tolerance in MHC class I-deficient mice. *Eur J Immunol* 1998;28:1315-1321.
 77. Hansson M, Karre K, Kiessling R, Roder J, Andersson B, Hayry P. Natural NK-cell targets in the mouse thymus: characteristics of the sensitive cell population. *J Immunol* 1979;123:765-771.

78. Hansson M, Kiessling R, Andersson B, Karre K, Roder J. NK cell-sensitive T-cell subpopulation in thymus: inverse correlation to host NK activity. *Nature* 1979;278:174-176.
79. Ono A, Amos DB, Koren HS. Selective cellular natural killing against human leukaemic T cells and thymus. *Nature* 1977;266:546-548.
80. Hoglund P, Ohlen C, Carbone E, Franksson L, Ljunggren HG, Latour A, Koller B, et al. Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10332-10336.
81. Sentman CL, Olsson MY, Salcedo M, Hoglund P, Lendahl U, Kare K. H-2 allele-specific protection from NK cell lysis in vitro for lymphoblasts but not tumor targets. Protection mediated by alpha 1/alpha 2 domains. *J Immunol* 1994;153:5482-5490.
82. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999;285:26-30.
83. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, Reiser M, et al. Comprehensive analysis of CD8(+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J Virol* 2002;76:6104-6113.
84. Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, et al. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest* 2003;112:831-842.
85. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458.
86. Barnes E, Harcourt G, Brown D, Lucas M, Phillips R, Dusheiko G, Klenerman P. The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:743-754.
87. Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, Komatsu H, Dusheiko G, Ward S, Harcourt G, et al. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2003;85:165-171.
88. King JK, Yeh SH, Lin MW, Liu CJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS, et al. Genetic polymorphisms in interferon pathway and response to interferon treatment in hepatitis B patients: A pilot study. *Hepatology* 2002;36:1416-1424.
89. Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 2001;44:379-382.
90. Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, Kaneshige T, et al. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 1998;27:240-244.
91. Cucchiari M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Gruner N, Santantonio T, et al. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol* 2000;203:111-123.
92. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002;76:12584-12595.
93. Diepolder HM, Zchoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-1007.
94. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with

- different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996;98:706-714.
95. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-941.
 96. Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, et al. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 1997;71:6011-6019.
 97. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003;37:577-589.
 98. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.
 99. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15661-15668.
 100. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-449.
 101. Vertuani S, Bazzaro M, Gualandi G, Micheletti F, Marastoni M, Fortini C, Canella A, et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur J Immunol* 2002;32:144-154.
 102. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994;1:793-801.
 103. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 1995;182:459-465.
 104. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1:405-413.
 105. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 1995;270:985-988.
 106. Manzotti CN, Tipping H, Perry LC, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y, Sansom DM. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2888-2896.
 107. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
 108. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-310.
 109. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2996-3005.
 110. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-511.

111. Aguilar F, Torres B, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. CTLA4 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003;64:936-940.
112. Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, Perez-Lezaun A, Calafell F, Bertranpetit J, Comas D. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. *Genes Immun* 2003;4:132-137.
113. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31:49-53.
114. Agarwal K, Jones DE, Daly AK, James OF, Vaidya B, Pearce S, Bassendine MF. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000;32:538-541.
115. Agarwal K, Jones DE, Bassendine MF. Genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:603-606.
116. Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2001;62:1356-1362.
117. Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1616-1620.
118. Deichmann K, Heinzmann A, Bruggenolte E, Forster J, Kuehr J. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:817-818.
119. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 1996;5:1075-1080.
120. Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, Trompette A, Belkaid Y, Thomas DL, Karp CL. Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol* 2005;35:2157-2162.
121. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000;165:6606-6611.
122. Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001;2:145-152.
123. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A Molecular Perspective of CTLA-4 Function. *Annu Rev Immunol* 2005;8:8.
124. Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, Karp CL, Strathdee SA, Vlahov D, O'Brien SJ, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2004;78:11258-11262.
125. Yee LJ, Perez KA, Tang J, van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Association of CTLA4 polymorphisms with sustained response to interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1264-1271.
126. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530.
127. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, et al. Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004;41:652-658.
128. Wasmuth HE, Werth A, Mueller T, Berg T, Dietrich CG, Geier A, Gartung C, et al. Haplotype-tagging RANTES gene variants influence response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2004;40:327-334.

129. Sarrazin C, Berg T, Weich V, Mueller T, Frey UH, Zeuzem S, Gerken G, et al. GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa/ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection. *J Hepatol* 2005;43:388-393.
130. Kast RE. Predominance of autoimmune and rheumatic diseases in females. *J Rheumatol* 1977;4:288-292.
131. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 2000;107:343-349.
132. Xie Y, Xu DZ, Lu ZM, Luo KX, Jia JD, Wang YM, Zhao GZ, et al. Predictive factors for sustained response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C: a randomized, open, and multi-center controlled trial. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4:213-219.
133. Reddy J, Waldner H, Zhang X, Illes Z, Wucherpfennig KW, Sobel RA, Kuchroo VK. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005;175:5591-5595.
134. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998;161:1947-1953.
135. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002;100:4512-4520.
136. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195:1507-1512.
137. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:362-371.
138. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, Oesterich JL, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002;218:74-86.
139. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.
140. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499.
141. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6646-6651.
142. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003;33:2987-2997.
143. Edwards L, Ferenczy A, Eron L, Baker D, Owens ML, Fox TL, Hougham AJ, et al. Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. *Human PapillomaVirus. Arch Dermatol* 1998;134:25-30.
144. Prins RM, Craft N, Bruhn KW, Khan-Farooqi H, Koya RC, Stripecke R, Miller JF, et al. The TLR-7 Agonist, Imiquimod, Enhances Dendritic Cell Survival and Promotes Tumor Antigen-Specific T Cell Priming: Relation to Central Nervous System Antitumor Immunity. *J Immunol* 2006;176:157-164.
145. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-1529.

146. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-1531.
147. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;202:1171-1177.
148. Lee J, Wu CC, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, Liu YT, Chan M, et al. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1828-1833.
149. Nagahara K, Anderson JD, Kini GD, Dalley NK, Larson SB, Smee DF, Jin A, et al. Thiazolo[4,5-d]pyrimidine nucleosides. The synthesis of certain 3-beta-D-ribofuranosylthiazolo[4,5-d]pyrimidines as potential immunotherapeutic agents. *J Med Chem* 1990;33:407-415.
150. Smee DF, Alaghamandan HA, Cottam HB, Sharma BS, Jolley WB, Robins RK. Broad-spectrum in vivo antiviral activity of 7-thia-8-oxoguanosine, a novel immunopotentiating agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1487-1492.
151. Smee DF, Huffman JH, Gessaman AC, Huggins JW, Sidwell RW. Prophylactic and therapeutic activities of 7-thia-8-oxoguanosine against Punta Toro virus infections in mice. *Antiviral Res* 1991;15:229-239.
152. Solinas A, Cossu P, Poddighe P, Tocco A, Deplano A, Garrucciu G, Diana MS. Changes of serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity during interferon treatment of chronic hepatitis C. *Liver* 1993;13:253-258.
153. MacQuillan GC, Mamotte C, Reed WD, Jeffrey GP, Allan JE. Upregulation of endogenous intrahepatic interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003;70:219-227.
154. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S408-415.
155. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522-1525.
156. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 2004;41:808-813.
157. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocana MG, Meana A, Carton JA, et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006;143:404-413.
158. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001;184:640-642.
159. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003;198:1563-1572.
160. Bonkovsky HL, Troy N, McNeal K, Banner BF, Sharma A, Obando J, Mehta S, et al. Iron and HFE or TfR1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2002;37:848-854.
161. Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:1929-1936.

162. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Schirin-Sokhan R, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 2005;37:835-843.
163. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833.
164. Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, et al. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003;125:1085-1093.
165. Sonzogni L, Silvestri L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, Bottelli R, et al. Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase gene and severity of HCV-related liver disease. *Hepatology* 2002;36:195-201.
166. Berghofer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol* 2006;177:2088-2096.
167. Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* 2001;166:5430-5438.
168. Limmer A, Sacher T, Alferink J, Kretschmar M, Schonrich G, Nichterlein T, Arnold B, et al. Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *Eur J Immunol* 1998;28:2395-2406.
169. Bertolino P, Heath WR, Hardy CL, Morahan G, Miller JF. Peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells in transgenic mice expressing H-2Kb in the liver. *Eur J Immunol* 1995;25:1932-1942.
170. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol* 2002;80:84-92.
171. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Rabourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8+ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol* 1998;28:221-236.
172. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, Fazekas de St Groth B, Pihlgren M, Marvel J, Rabourdin-Combe C. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol* 1999;11:1225-1238.
173. Klein I, Crispe IN. Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver. *J Exp Med* 2006;203:437-447.
174. Wuensch SA, Pierce RH, Crispe IN. Local intrahepatic CD8+ T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation. *J Immunol* 2006;177:1689-1697.
175. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701-712.
176. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2003;3:383-391.
177. Hammerling GJ, Schonrich G, Momburg F, Auphan N, Malissen M, Malissen B, Schmitt-Verhulst AM, et al. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev* 1991;122:47-67.
178. Wang F, Huang CY, Kanagawa O. Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11834-11839.
179. McGargill MA, Derbinski JM, Hogquist KA. Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol* 2000;1:336-341.

180. Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA. The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J Exp Med* 2005;202:111-121.
181. Mick VE, Starr TK, McCaughtry TM, McNeil LK, Hogquist KA. The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive selection in vivo. *J Immunol* 2004;173:5434-5444.
182. Laufer TM, Glimcher LH, Lo D. Using thymus anatomy to dissect T cell repertoire selection. *Semin Immunol* 1999;11:65-70.
183. Bousso P, Bhakta NR, Lewis RS, Robey E. Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 2002;296:1876-1880.
184. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 2004;200:493-505.
185. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 2003;4:350-354.
186. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298:1395-1401.
187. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 2004;200:1039-1049.
188. Buhlmann JE, Elkin SK, Sharpe AH. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* 2003;170:5421-5428.
189. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005;6:331-337.
190. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-352.
191. Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:217-246.
192. Franki AS, Van Beneden K, Dewint P, Meeus I, Veys E, Deforce D, Elewaut D. Lymphotoxin alpha 1 beta 2: a critical mediator in V alpha 14i NKT cell differentiation. *Mol Immunol* 2005;42:413-417.
193. Tang X, Maricic I, Purohit N, Bakamjian B, Reed-Loisel LM, Beeston T, Jensen P, et al. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J Immunol* 2006;177:7645-7655.
194. Norcross MA. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 1984;135D:113-134.
195. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221-227.
196. Wulfig C, Davis MM. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 1998;282:2266-2269.
197. Brossard C, Feuillet V, Schmitt A, Randriamampita C, Romao M, Raposo G, Trautmann A. Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* 2005;35:1741-1753.
198. Richie LI, Ebert PJ, Wu LC, Krummel MF, Owen JJ, Davis MM. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 2002;16:595-606.
199. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002;109:901-912.

200. Risueno RM, van Santen HM, Alarcon B. A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9625-9630.
201. Hennecke J, Wiley DC. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 2001;104:1-4.
202. Reiser JB, Gregoire C, Darnault C, Mosser T, Guimezanes A, Schmitt-Verhulst AM, Fontecilla-Camps JC, et al. A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity* 2002;16:345-354.
203. Rudolph MG, Wilson IA. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr Opin Immunol* 2002;14:52-65.
204. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 2002;419:845-849.
205. Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 2004;5:524-530.
206. Davis MM, Krogsgaard M, Huse M, Huppa JB, Lillemeier BF, Li QJ. T Cells as a Self-Referential, Sensory Organ. *Annu Rev Immunol* 2007;25:2-2.
207. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33-39.
208. Sporri R, Reis e Sousa C. Self peptide/MHC class I complexes have a negligible effect on the response of some CD8+ T cells to foreign antigen. *Eur J Immunol* 2002;32:3161-3170.
209. Yachi PP, Ampudia J, Gascoigne NR, Zal T. Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat Immunol* 2005;6:785-792.
210. Stefanova I, Dorfman JR, Germain RN. Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 2002;420:429-434.
211. Jiang D, Lenardo MJ, Zuniga-Pflucker C. p53 prevents maturation to the CD4+CD8+ stage of thymocyte differentiation in the absence of T cell receptor rearrangement. *J Exp Med* 1996;183:1923-1928.
212. Haks MC, Krimpenfort P, van den Brakel JH, Kruisbeek AM. Pre-TCR signaling and inactivation of p53 induces crucial cell survival pathways in pre-T cells. *Immunity* 1999;11:91-101.
213. Michaelsson J, Achour A, Salcedo M, Kase-Sjostrom A, Sundback J, Harris RA, Karre K. Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *Eur J Immunol* 2000;30:300-307.
214. Parks CG, Hudson LL, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. CTLA-4 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a population-based study of whites and African-Americans in the southeastern United States. *Lupus* 2004;13:784-791.
215. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006;144:188-196.
216. Manigold T, Shin EC, Mizukoshi E, Mihalik K, Murthy KK, Rice CM, Piccirillo CA, et al. Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* 2006;107:4424-4432.
217. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860-7867.

218. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-1071.
219. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006;43:S132-144.
220. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006;354:54-66.

Danksagung

Mein Dank gilt allen denjenigen, die mich auf dem Weg zur Habilitation begleitet und unterstützt haben. Insbesondere trifft das auf Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann zu, dem ich herzlich für seine andauernde Unterstützung und Ermutigung, sowohl bei meiner klinischen Ausbildung als auch bei meinen Forschungsarbeiten, danken möchte. Damit verbunden bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité, Campus Virchow Klinikum, die mir geholfen haben, eine fundierte klinische Ausbildung zu erlangen und ein Labor aufzubauen, namentlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Stopik, Herrn Prof. Dr. Stefan Rosewicz, Herrn Prof. Dr. Uwe Hopf und Herrn PD Dr. Thomas Berg für ihre Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hidde Ploegh, in dessen Arbeitsgruppe ich zweieinhalb Jahre verbringen und in dessen Labor ich die Grundlagen der Immunologie lernen durfte. Weiterhin danke ich den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, ohne deren Hilfe und Zusammenarbeit keine der Arbeiten abgeschlossen worden wären, insbesondere gilt das für Frau Dr. Justine Mintern.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch bei der Unterstützung der Organisation meines Auslandsaufenthaltes sowie der Etablierung meiner Arbeitsgruppe nach der Rückkehr nach Berlin.

Schließlich gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern für Ihre Unterstützung und Seija für ihre Geduld, Hilfe und Ermutigung, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde gleich welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 12.03.2007

Dr. med. Eckart Schott